

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

AGHION née PRAT Danielle

1^{re} THÈSE — “ NÉOFORMATION DE FLEURS *in vitro* CHEZ *Nicotiana Tabacum* L ”.

2^e THÈSE — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ
“ ORGANOGÈNESE AU NIVEAU DES TUMEURS EXPÉRI-
MENTALES ”.

25 OCT 1965

Soutenues le , devant la Commission d'examen

MM. CHOUARD	Président
ULRICH	} Examinateurs
MOREL	

PARIS-6^e
GAUTHIER-VILLARS, Editeur
55, quai des Grands-Augustins
1965



Digitized by the Internet Archive
in 2026

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

AGHION née PRAT Danielle

1^{re} THÈSE — “ NÉOFORMATION DE FLEURS *in vitro* CHEZ *Nicotiana Tabacum* L ”.

2^e THÈSE — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ
“ ORGANOGÈNESE AU NIVEAU DES TUMEURS EXPÉRI-
MENTALES ”.

Soutenues le , devant la Commission d'examen

MM. CHOUARD	Président
ULRICH	} Examinateurs
MOREL	

PARIS-6^e
GAUTHIER-VILLARS, Editeur
55, quai des Grands-Augustins
1965



FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

Doyen M. ZAMANSKY

PROFESSEURS

BRELOTT	Analyse supérieure.	NORMANTT	Synthèse organique.
PRENANTT	Anatomie et Histologie comparées.	BENARDT	Chimie minérale.
GRASSÉT	Evolution des êtres organisés.	BUVATT	Botanique (E.N.S.).
PRÉVOSTT	Chimie organique.	DUGUET	Statistiques mathématiques.
WYARTT	Minéralogie et Cristallographie.	SOULAIRACT	Psychophysiologie.
TEISSIERT	Zoologie.	ULRICHT	Physiologie végétale appliquée.
MANGENOTT	Biologie végétale (Orsay).	MARÉCHALT	Optique théorique et appliquée.
AUGERT	Physique quantique et Relativité.	KIRRMANNT	Théories chimiques.
MONNIERT	Physiologie générale.	CHADEFAUDT	Botanique.
PIVETEAUT	Paléontologie.	Mlle LE BRETON	Physiologie de la nutrition.
ROCARDT	Physique (E.N.S.).	LELONGT	Application de l'Analyse à la Géométrie.
CARTANT	Mathématiques (E.N.S.).	DEVILLERST	Anatomie et Histologie comparées.
LAFFITTET	Chimie générale.	EHRESMANNT	Topologie algébrique.
N.T	Géométrie supérieure.	FRANÇONT	Physique (S.P.C.N.).
COULOMBT	Physique du globe.	GLANGEAUDT	Géographie physique et Géologie.
Mlle COUSIN	Biologie animale (S.P.C.N.).	DODEMENTT	Mathématiques (M.G.P.).
CHRÉTIENT	Chimie minérale.	PISOTT	Techniques mathématiques de la Physique.
BOCQUETT	Zoologie.	ROCHT	Géologie.
KASTLERT	Physique (E.N.S.).	SCHATZMANNT	Astrophysique.
ÉPHRUSSIT	Génétique.	TERMIERT	Géologie générale.
RIVIÈRET	Géologie (S.P.C.N.) et Sédimentologie (Orsay).	ZAMANSKYT	Mathématiques générales.
GAUTHERETT	Biologie végétale (P.C.B.).	LENNUIERT	Physique (M.G.P.).
LUCAS R.T	Recherches physiques.	RIZETT	Génétique (Orsay).
THOMAS A.T	Biologie cellulaire.	ROUTHIERT	Géologie appliquée.
ARNULFT	Optique appliquée.	Mme TONNELAT	Physique théorique.
MORANDT	Physique enseignement.	DIXMIERT	Mathématiques (M.P.C.).
SOLEILLETT	Physique (P.C.B.).	SOUCHAYT	Chimie générale.
FORTIERT	Mécanique expérimentale des fluides.	AIGRAINT	Electrotechnique générale.
DRACHT	Zoologie.	BRUSSETT	Chimie systématique.
QUENEYT	Météorologie et Dynamique atmosphérique.	LÉVY M.T	Physique théorique des hautes énergies (Orsay).
GALLIENT	Embryologie.	Mme CHAIXT	Chimie biologique.
EICHHORNT	Botanique.	Mme HUREL-PY	Biologie végétale (P.C.B.).
DE CUGNACT	Biologie végétale (S.P.C.N.).	PANNETIERT	Chimie générale.
Mlle CAUCHOIS	Chimie physique.	BRUNT	Mécanique théorique des fluides.
THELLIERT	Physique du globe.	LEDERERT	Chimie biologique (Orsay).
L'HÉRITIERT	Biologie générale (Orsay).	Mme DUBREIL	Mathématiques (Agrégation).
GRIVETT	Radioélectricité (Orsay).	Mme LELONG	Mathématiques II (E.N.S.).
PONCINT	Chimie générale.	BELLAIRT	Géologie (S.P.C.N.).
DUBREILT	Arithmétique et Théorie des nombres.	COTTET	Physique Electricité.
QUELETT	Chimie organique.	DUBOIS J.E.T	Chimie organique.
CAGNIARDT	Géophysique appliquée.	LAMOTTET	Zoologie (E.N.S.).
CHAMPETIERT	Chimie macromoléculaire.	MICHEL A.T	Chimie minérale (Orsay).
CUVILLIERT	Micropaléontologie.	OLMERT	Energétique générale.
JUNGT	Géologie.	ROUAULTT	Electricité (Orsay).
TRILLATT	Microscopie et Diffraction électronique.	GAUTHIERT	Mécanique appliquée.
WIEMANNT	Chimie organique et structurale.	BACHEWITZT	Chimie physique.
JACQUINOTT	Spectroscopie et Physique céleste (Orsay).	BROSSELT	Physique atomique.
VASSYT	Physique de l'atmosphère.	BUSERT	Physiologie comparée.
DESTOUCHEST	Théories physiques.	CAMUST	Physiologie végétale.
AMIELT	Chimie générale.	CASTAINGT	Physique II Thermodynamique (Orsay).
HOCARTT	Minéralogie et Cristallographie.	CURIENT	Minéralogie et Cristallographie.
MATHIEU J.P.T	Physique optique.	MOYSET	Physiologie végétale (Orsay).
COUTEAUXT	Cytologie.	Mme CHARNIAUX-	
MAYT	Zoologie.	COLTONT	Evolution des êtres organisés.
CHOQUETT	Théorie des fonctions et Topologie.	POSSOMPEST	Zoologie.
FELDMANNT	Biologie végétale marine.	PULLMANNT	Chimie quantique.
GUINIERT	Physique des solides (Orsay).	TEILLACT	Physique nucléaire et Radioactivité (Orsay).
JOSTT	Physiologie comparée.	TONNELATT	Biologie physico-chimique. (Orsay).
FORTETT	Calcul des probabilités et Physique mathématique.	VILLET	Econométrie.
SCHWARTZT	Calcul différentiel et intégral.	WILLEMARTT	Chimie (P.C.B.).
CHOUDARDT	Physiologie végétale.	DODET	Chimie (Orsay).
MALAVARDT	Aviation (Technique aéronautique).	FREYMANNT	Recherches physiques.
		GUINOCHETT	Biologie végétale (S.P.C.N. Orsay).
		ROLLET	Chimie minérale.

Mlle JOSIEN....	T	Chimie (S.P.C.N.).	OLIVIER	Anthropologie.
CHEVALLEY	T	Géométrie algébrique et Théorie des groupes.	NOZERAN	T Botanique II (Orsay).
ARNOULT	T	Electronique (Orsay).	BLANC-LAPIERRE	T Physique (E.N.S. Orsay).
CHAPELLE	T	Physique I (Orsay).	CHEVAUGEON ..	T Botanique (Orsay).
DELANGE	T	Mathématiques I (Orsay).	KAHANE	T Mathématiques (Orsay).
DENY	T	Mathématiques générales (Orsay).	SAMUEL	T Mathématiques (E.N.S. féminine).
GERMAIN	T	Mécanique théorique des fluides.	KOURGANOFF ..	T Astronomie (Orsay).
LUCAS	T	Géologie.	THIERY	T Mécanique céleste.
ALLARD	T	Chimie physique.	ABELES	T Physique (S.P.C.N.).
BERTHELOT	T	Physique des particules fondamentales (Orsay).	AMAT	T Physique (P.C.B.).
BRICART	T	Météorologie et Physique de l'atmosphère.	AUBOIN	T Géologie.
Mme ALBE- FESSARD	T	Psychophysiologie.	Mme BENOIT- GUEUTAL	Physique nucléaire et Radio-activité (Orsay).
FRIEDEL	T	Physique des solides (Orsay).	BOUGIS	Biologie marine (Villefranche-sur-Mer).
JULIA M.	T	Etudes des molécules complexes.	BRUHAT	T Mathématiques (M.P.C.).
LENDER	T	Biologie animale (S.P.C.N. Orsay).	BRUNN	T Géologie historique (Orsay).
MAGAT	T	Physico-chimie des radio-éléments.	CHABBAL	T Physique (M.G.P. Orsay).
Mlle QUINTIN .	T	Electrochimie.	DEHEUVELS ..	T Mathématiques propédeutiques.
MONOD	T	Chimie du métabolisme.	D'ESPAGNAT ..	T Physique théorique (Orsay).
BERNOIT	T	Physiologie animale (Orsay).	FURON	T Géologie (S.P.C.N.).
DE POSSEL	T	Analyse numérique.	Mme GANS	T Génétique.
CHARLOT	T	Chimie analytique.	GENEVES	Biologie végétale (P.C.B.).
LEMÉE	T	Ecologie végétale (Orsay).	GUILBERT	T Physique (C.U.S. Orléans).
GUÉRIN	T	Chimie (M.P.C. Orsay).	HUPE	T Pétrographie.
CHATELET M. ..	T	Chimie (P.C.B.).	HOLLANDE	T Biologie générale.
JEAN	T	Physique nucléaire (Orsay).	LIONS	T Analyse numérique.
MATTLER	T	Physique (S.P.C.N.).	MAITTE	T Chimie (P.C.B.).
BERGERARD ..	T	Zoologie (Orsay).	MEYER	Physique propédeutique.
BERTEIN	T	Electronique (Orsay).	NICOLAS	Géologie appliquée.
Mme COUTURE .	T	Radiochimie.	PANIGEL	Biologie générale.
ELLENBERGER ..	T	Thermodynamique et Mécanique physique.	RAVIER	Pétrographie.
FRANC	T	Géologie des grandes régions du globe (Orsay).	ROSEAU	T Mécanique théorique des fluides.
SCHNELL	T	Biologie animale (P.C.B.).	ROUBINE	Electronique.
STOLKOWSKI ..	T	Botanique tropicale.	SILBER	T Chimie (P.C.B.).
ACHER	T	Physiologie végétale.	UEBERSFELD ..	T Electronique.
BAUDOUIN	T	Chimie biologique.	YVON	T Théories physiques.
BEAUMONT	T	Biologie animale (P.C.B.).	HERVÉ	T Mathématiques.
BLAMONT	T	Biologie animale (S.P.C.N.).	NÉRON	T Math. M.P.C. (Orsay).
BOURREAU	T	Géophysique ionosphère.	Mme PECKER ..	
BOURREAU	T	Botanique.	WIMEL	T Astrophysique.
CURIE D.	T	Physique (M.G.P.).	BALKANSKY ..	Physique M.P.C.
DURAND-DELGA	T	Géologie.	LE CORRE	T Electricité.
FREON	T	Chimie organique (Orsay).	DELcroix	T Physique théorique (Orsay).
HELLER	T	Physiologie végétale.	GOURDIN	Physique théorique des hautes énergies (Orsay).
TORTRAT	T	Calcul des probabilités.	LEHMANN	T Phys. exp. des hautes énergies.
CAILLEUX	T	Géologie (S.P.C.N.).	NATAF	T Physique nucléaire et radio-activité (Orsay).
MAGNAN	T	Physique Electricité.	ECHALIER	Biologie animale P.C.B.
DAUDEL	T	Mécanique ondulatoire appliquée à la Chimie théorique et à la Physique nucléaire.	BARRAUD	Physiologie-cellulaire.
Mlle FOURCROY ..		Biologie végétale (S.P.C.N.).	LORET	Physiologie végétale (Orsay).
Mme CHOQUET- BRUHAT	T	Mécanique analytique et Mécanique céleste.	DARS	Géologie structurale et géologie appliquée.
Mlle VEIL		Physiologie générale.	CAMEFORT	T Botanique (agrégation).
LWOFF	T	Microbiologie.	VICHNIEWSKY ..	T Mécanique industrielle.
SIESTRUNCK ..	T	Mécanique physique et expérimentale.	BLAQUIÈRE	Electronique (Orsay).
LACOMBE	T	Métallurgie des métaux nucléaires (Orsay).	ARNOUS	T Physique théorique.
BROCHARD	T	Physique (P.C.B. Orsay).	TATIBOUET ..	Chimie (C.S.U. Orléans).
CABANNES	T	Mécanique générale.	MALLIVIN	T Math. propé. (Orsay).
LESIEUR	T	Mathématiques I (Orsay).	GAUDEMAR	Chimie propé.
MAZET	T	Mécanique générale (Orsay).	PÉREZ Y JORBA	Physique exp. des hautes énergies (Orsay).
CAIRE		Géographie physique et Géologie dynamique.	DAVID	T Chimie (agrégation Orsay).
COMOLET		Mécanique des fluides.	BROUSSE	T Mécanique théorique.
CORABŒUF	T	Physiologie animale (Orsay).	ROSCH	T Astronomie.
DELLOUE	T	Physique de l'exosphère.	GUY	T Physique expérimentale.
GORENFLOT		Botanique II (Orsay).	LAZARD	Math. M.P.C.
HOULLON		Biologie animale (P.C.B.).	MOREL P	Physique M.P.C.
JULIEN J.		Chimie (S.P.C.N. Orsay).	ARSAC	Programmation.
MALGRANGE ..	T	Techniques mathématiques de la Physique (Orsay).	LEFEBVRE	Chimie M.P.C.
			CHAPEVILLE ..	Biochimie.
			BENOIT	Physique C.P.E.M.
			RIO	Chimie C.P.E.M.
			JAUZEIN	Géologie E.N.S.
			PREVOST G	B.V., C.P.E.M.
			FAVARD P.	B.A., C.P.E.M.
			VILKAS	Chimie C.P.E.M.
			Mlle FICINI	Chimie C.P.E.M.
			LEQUEUX	Astronomie.

COHEN TAN- NOUDJI	Physique M.P.C.	CERF	Mathématiques (Orsay).
TAVERNIER	Physique C.P.E.M.	LURCAT	Physique.
Mme ROIZEN ..	Physique C.P.E.M.	RIGAUDY	Chimie S.P.C.N.
DURAND M.	B.A., S.P.C.N.	SIGWALT	Chimie S.P.C.N.
PASCAUD	Physiologie.	FOURNET	Electricité générale.
Mme PETIT	B.A., C.P.E.M.	COLLONGUES ..	Chimie C.P.E.M.
BROUSSE	Géologie (Orsay).	DUBERT	Biochimie.
CAGNIAC	Physique agrégation (Orsay).	LAVOREL	Biologie physico-chimique.
LEBERRE	Zoologie (Orsay).	MOREL F.	Physiologie comparée.
SCHEFFER	Microbiologie (Orsay).	TALBOT	Génétique chimique.
DE GENNES	Physique des solides (Orsay).	Mme NOUGARÈDE	Botanique.
RIOU	Physique nucléaire exp. (Orsay).	FRANÇOIS	Zoologie.
CLAUSER	Chimie biol. (Orsay).	IVANOFF	Océanographie physique.
CHEVALIER	Physio. animale (Orsay).	CADIOT	Chimie organique.
JANCOVICI	Physique atomique (Orsay).	BARUCH	Physique propédeutique.
FALK-VAIRANT .	Physique nucléaire (Orsay).	NOZIÈRES	Physique générale.
FETIZON	Chimie propé. (Orsay).	BOK	Physique propédeutique.
		SLONIMSKI	Génétique.

Secrétaire général R. POULAIN

Néoformation de fleurs *in vitro* chez *Nicotiana Tabacum* L.

Danielle AGHION-PRAT

Laboratoire du Phytotron, C.N.R.S., Gif-sur-Yvette (S.-&-O.), France

(Manuscrit reçu le 25 juin 1965)

RÉSUMÉ

Les bourgeons néoformés *in vitro*, à partir des fragments de tige de *Nicotiana Tabacum* cultivar « Wisconsin 38 », manifestent un gradient axial de prédisposition à la floraison dont la plus remarquable expression est la néoformation directe de fleurs, sans feuilles ni racines, à partir des fragments de la hampe florale. La néoformation de fleurs a été observée chez 12 variétés de *Nicotiana Tabacum* et chez d'autres espèces de *Nicotiana* de photopériodisme non absolu. Cette aptitude à fleurir est retrouvée lorsque le bourgeonnement est induit *in vivo*.

Les fleurs sont néoformées de la manière décrite classiquement pour les bourgeons végétatifs.

La lumière est nécessaire à la néoformation des méristèmes. Une concentration suffisamment élevée de glucides est nécessaire à leur floraison. De plus les concentrations élevées de glucose favorisent la floraison des bourgeons néoformés sur la tige, à des concentrations qui inhibent le bourgeonnement végétatif.

L'apport exogène de substances de croissance : kinétine, auxine et acide gibbérellique, perturbe le gradient de floraison.

Chez *Nicotiana Tabacum*, au cours de l'ontogenèse, les tissus acquièrent déjà une potentialité de floraison qui s'exprime par la floraison immédiate des méristèmes néoformés à partir des tissus de la hampe florale, en présence d'un apport énergétique de sucre.

SUMMARY

Buds formed *de novo* from stem segments of *Nicotiana Tabacum* cultivar « Wisconsin 38 » cultured *in vitro*, show a flowering-ability gradient along their axis, the most striking phenomenon being the formation of flowers but not of roots or leaves when segments from the flowering part of the stem are used. This phenomenon is observed with 12 varieties of *Nicotiana Tabacum* and other *Nicotiana* species without any photoperiodic requirement. This flowering-ability is shown also when budding is induced *in vivo*.

Flowers are formed from basal callus as usually described for vegetative buds. Meristem initiation requires light, and flowering the presence of sugars. When high levels of glucose are used pieces from all part of the stems form floral buds. Growth substances as kinetin, auxin, gibberellic acid disturb the flowering gradient.

In *Nicotiana Tabacum*, during ontogenesis, the tissues acquire flowering abilities that express themselves immediately by the flowering of meristems formed *de novo* from the inflorescence axis, provided glucose is supplied.

INTRODUCTION

Il est classique de considérer une « *plante entière* » au stade végétatif comme formée d'organes fondamentaux qui sont, d'un côté les racines, de l'autre les bourgeons végétatifs producteurs de tiges feuillées. Une autre sorte d'organe complexe, la « *fleur* », se forme ensuite : plus ou moins progressivement un « *bourgeon végétatif* » se transforme en « *bouton floral* ».

On conçoit ainsi que les premiers et maintenant encore les plus nombreux travaux expérimentaux sur la « *mise à fleur* », aient été accomplis avec des « *plantes entières* », possédant tous leurs organes, et soumises à différents âges aux influences de divers facteurs de l'environnement.

Ce n'est que plus tard que l'on a tenté de « *cultiver des parties de plantes* » pour analyser les facteurs de la mise à fleur : en culture aseptique, dans un milieu bien défini, on est alors maître d'introduire les constituants de milieux nutritifs complexes comme les sucres ou des agents organiques de la croissance.

C'est ainsi que la floraison a pu être obtenue à partir des extrémités apicales de tiges isolées de la plante, et cultivées *in vitro* : les premiers auteurs prélevaient toute l'extrémité apicale comportant plusieurs jeunes feuilles ; on s'est aperçu par la suite que la présence des tout derniers primordiums foliaires suffisait à assurer le fonctionnement normal du méristème isolé *in vitro* (BALL, 1946 ; MOREL et MARTIN, 1955).

LOO obtenait en 1946 la floraison de l'extrémité apicale de la *Cuscuta* ; depuis, divers auteurs (HENRICKSON, 1954 ; BUTENKO, 1960 ; RAGHAVEN et JACOBS, 1961 etc.) ont pu induire la floraison d'apex isolés de plusieurs espèces. Une petite plante complète avec racines et tige feuillée peut se reconstituer avant de fleurir, mais récemment RODRIGUES PEREIRA (1961) d'une part, RAGHAVEN et JACOBS (1961) sur *Perilla* d'autre part, ont pu induire la mise à fleur sans que les apex isolés produisent de nouvelles feuilles et sans que soit nécessaire la formation préalable de racines.

Des apex floraux ont pu récemment être prélevés après initiation des premières pièces florales et poursuivre la différenciation de tissu inflorescentiel (COLEMAN et NICKELL, 1964) ou de pièces florales (GALUN, JUNG et LANG, 1962 ; TEPFER et coll., 1963).

Enfin, la « *culture in vitro* » de *fragments d'organes dépourvus initialement de points de croissance* et de tout bourgeon, par exemple de segments d'entre-nœuds de tige, a permis d'obtenir dans certains cas la néoformation de « *méristèmes gemmaires* », points végétatifs ou bourgeons végétatifs (SEGRETAIN, 1941 ; GAUTHERET, 1942 ; MOREL, 1948 ; SKOOG et TSUI, 1948). Il ne semble pas que jusqu'à ces dernières années et malgré l'apparition sporadique de quelques boutons floraux dans ces conditions, la néoformation de méristèmes gemmaires *in vitro* ait été considérée également comme un nouveau moyen d'aborder les problèmes de la floraison.

C'est justement en ce point de l'histoire des recherches sur l'organogenèse florale que s'insèrent nos propres recherches. Au cours d'essais de culture aseptique de fragments de tige de Tabac cultivar « Wisconsin 38 » réalisés en s'inspirant de la technique de SKOOG et TSUI (1948), nous avons observé en 1960 que les bourgeons néoformés à partir du cal développé au pôle proximal des fragments, ne fleurissaient pas simultanément lorsqu'ils étaient repiqués en serre dans les mêmes conditions. Certains bourgeons ont fleuri après avoir formé 8 feuilles seulement (Pl. I,1) ; la plupart des autres ne fleurissaient que beaucoup plus tard après avoir formé une soixantaine de feuilles.

Ces « incidents floraux » pouvaient paraître fortuits ; mais nous avons prélevé nos fragments sur la tige de Tabacs en fleur, alors que les auteurs utilisent habituellement des plantes végétatives. Nous avons donc recherché systématiquement si les « incidents » observés ne proviendraient pas de l'état des Tabacs employés et du niveau de prélèvement des fragments.

Utilisant la technique de culture *in vitro*, nous avons alors cultivé des fragments prélevés sur toute la longueur de la tige des Tabacs, fleuris ou non, sur un milieu de culture très simple ne contenant aucune substance de croissance. Cette étude qui fait l'objet de la première partie de ce mémoire, nous a conduit dans ce cas à déceler l'existence d'un « gradient axial » de l'aptitude à fleurir des bourgeons néoformés, dont la plus remarquable manifestation est la néoformation de fleurs, directement, sans que ni feuilles ni racines n'apparaissent lorsque les fragments sont prélevés sur l'axe inflorescentiel.

Dans la deuxième partie de notre travail, nous nous sommes limitée à l'étude de la néoformation de ces fleurs à partir des fragments de hampe inflorescentielle de Tabac. Le premier Chapitre relate nos tentatives pour améliorer les conditions de prélèvement de façon à ce que les organes néoformés dans le cal proximal des fragments de hampe soient abondants et exclusivement représentés par des boutons floraux. Le second Chapitre comprend l'étude descriptive de cette « organogenèse florale de novo » depuis le début de la prolifération du cal jusqu'à la fructification des fleurs néoformées. Le troisième Chapitre concerne alors l'influence des facteurs de l'environnement. Nous avons d'abord cherché à déterminer les facteurs nécessaires à la néoformation des fleurs, c'est-à-dire les facteurs les plus simples permettant aux fragments de hampe cultivés *in vitro* de proliférer et de former des boutons floraux. Puis dans un quatrième Chapitre qui prolonge le troisième, nous relatons les modifications apportées à cette mise à fleur des méristèmes gemmaires néoformés par l'adjonction au milieu de culture de substances de croissance. L'étude de l'action des facteurs de l'environnement a été faite en essayant de dissocier une action sur la genèse des méristèmes gemmaires, d'une action sur la mise à fleur.

En conclusion, ressortent ainsi avec plus de précision les premiers traits des étapes histologiques de la néoformation des méristèmes floraux et le rôle de divers facteurs, notamment des sucres et de certaines substances de croissance, sur le déroulement de l'organogenèse florale. Il semble aussi que la genèse des fleurs puisse être considérée d'un autre point de vue : le virage floral peut suivre immédiatement la genèse d'un méristème formé après la prolifération cellulaire consécutive à l'isolement d'un fragment d'organe hors des contraintes de la plante entière. Il s'ensuit qu'il est probablement plus fécond et plus important de se poser non pas la question classique « Pourquoi fleurissent les plantes ? », mais celle plus originale « Pourquoi les plantes ne fleurissent-elles pas plus tôt ni plus jeunes ? ».

HISTORIQUE

L'étude de la floraison des bourgeons néoformés *in vitro* concerne deux vastes problèmes, celui de l'organogenèse gemmaire et celui de la mise à fleur. Nous évoquons dans une première partie les grandes lignes des processus généraux de la néoformation des bourgeons à partir de la culture d'organe ; les facteurs affectant le

bourgeonnement, qui ont fait l'objet de récentes mises au point, notamment par GAUTHERET (1959, 1964), DORE (1965), WARDLAW (1965) ne seront traités qu'en ce qui concerne *Nicotiana Tabacum* « Wisconsin 38 ». Quelques considérations générales sur la floraison seront mentionnées dans une seconde partie de cet historique afin de dégager les aspects de la mise à fleur dont il faut tenir compte pour expliquer la floraison des bourgeons néoformés *in vitro*. Une troisième partie traitera des différents cas observés de floraison des bourgeons néoformés en culture d'organe *in vitro*.

La néoformation des bourgeons végétatifs en culture *in vitro*

Certaines plantes ont la potentialité de régénérer spontanément des bourgeons à partir des fragments d'organes cultivés *in vitro*, dépourvus d'ébauches préexistantes. Citons parmi les plantes qui ont fait l'objet d'une étude descriptive de ce phénomène : l'Orme (GAUTHERET, 1942), l'Endive (BUVAT, 1944 et CAMUS, 1949) le Tabac (STERLING, 1951). Dans tous les cas le bourgeonnement résulte de la différenciation d'un petit groupe de cellules qui se multiplient activement, acquièrent la structure des cellules de type méristématique primaire et s'organisent en méristème caulinaire. Signalons aussi que dans le cas particulier de la néoformation d'embryons par les tissus de carotte une seule cellule entre en division (REINERT, 1959 ; STEWARD et coll., 1963).

Le contrôle chimique du bourgeonnement chez le Tabac cultivar « Wisconsin 38 » a été étudié par SKOOG et ses collaborateurs. Rappelons tout d'abord que les fragments de tige de cette plante cultivés *in vitro* sur un milieu dépourvu de substances de croissance forment spontanément des bourgeons : la présence de la région vasculaire de la tige est nécessaire à la prolifération (JABLONSKY et SKOOG, 1954). C'est au pôle proximal des fragments que se forme le cal et qu'apparaissent les bourgeons ; c'est également dans cette région que s'accumule l'auxine (NIEDERGANG-KAMIEN et SKOOG 1956).

SKOOG a montré que l'adjonction au milieu d'auxine inhibe ce bourgeonnement et provoque la formation de racines ; pour des concentrations croissantes de sucre et de phosphate, l'inhibition du bourgeonnement par l'auxine est réduite (SKOOG et TSUI, 1948). Par contre l'adénine et d'autres composés du métabolisme des acides nucléiques favorisent la caulogénèse et contrecarrent l'action de l'auxine (SKOOG et TSUI, 1948 ; MILLER et SKOOG, 1953 ; SKOOG, 1954).

Avec l'usage de la kinétine (MILLER et coll. 1956) les recherches sur le bourgeonnement du Tabac se sont poursuivies à partir des tissus repiqués qui, cultivés en présence de cette substance et d'auxine, peuvent proliférer indéfiniment sans être anergisés (DUARTE, SPANJERSBERG et GAUTHERET, 1963). A partir de ces tissus se forment soit des racines, soit des bourgeons, selon les concentrations de kinétine et d'auxine utilisées ; d'après SKOOG et MILLER (1957) l'interaction quantitative

PLANCHE I. — Plantes de *Nicotiana Tabacum* « Wisconsin 38 », provenant de bourgeons néoformés *in vitro*, fleuries précocement en serre.

1. — Le premier exemple observé de bourgeon néoformé fleuri précocement.
2. — Bourgeon néoformé à partir d'un fragment provenant de la région sous-inflorescentielle de l'axe.



entre « facteurs de croissance », particulièrement entre auxine et kinétine, régit le mécanisme de la régulation de tous les types de croissance, du grandissement cellulaire à la formation d'organes.

Plus récemment MURASHIGE (1961 et 1964) montre que la gibbérelline inhibe la néoformation des bourgeons ou des racines induits à se former à partir des tissus repiqués de Tabac par des concentrations appropriées de kinétine et d'auxine.

L'action des facteurs physiques sur le bourgeonnement *in vitro* des tissus de *Nicotiana Tabacum* ne semble pas avoir fait l'objet de travaux spéciaux. Signalons seulement que SKOOG (1944) a montré que le bourgeonnement à partir de l'hybride *Nicotiana glauca* × *Langsdorffii* se fait à l'obscurité ou à la lumière faible ; GAUTHERET (1945) obtient le bourgeonnement des tissus d'Orme aussi bien à la lumière qu'à l'obscurité, mais les bourgeons ne se développent en pousse feuillée qu'à la lumière ; la région active du spectre est la région active sur la photosynthèse ; TORREY (1958) obtient seulement à la lumière la formation de bourgeons à partir de racines de *Convolvulus*.

Quelques considérations sur la floraison

KLEBS après de longues études antérieures dégage en 1918 la notion de 3 phases lors de la mise à fleur : l'induction florale, l'initiation florale, le développement floral.

L'induction florale résulte d'une modification biochimique et physiologique, encore bien peu connue actuellement, qui s'exprimera par une modification morphologique au niveau de l'apex (dans le cas des plantes à floraison terminale qui ont surtout été étudiées) ou au niveau des bourgeons axillaires proches de l'apex ; les cytologistes s'accordent actuellement (GIFFORD et LANCE-NOUGARÈDE, 1964) à dire que le premier signe de l'initiation florale est une modification dans la répartition de l'activité mitotique apicale et du caractère méristématique des cellules du massif terminal du bourgeon, suivie de la surrection des initiums des futures pièces florales en localisation ordinairement verticillée.

Au cours du développement floral, les pièces florales se différencient, puis leur croissance s'effectue, tandis que dans les anthères et dans l'ovaire la méiose s'accomplit. La *mise à fleur* est ainsi la *préparation à la tétrasporogénèse*.

Si la pollinisation et la fertilisation ont eu lieu, cette phase est suivie par la fructification et la maturation des graines.

Des mécanismes régulateurs distincts interviennent dans ces phénomènes de la mise à fleur (CHOUARD, 1949 *a, b*) ; les principaux sont la vernalisation, le photopériodisme, le thermopériodisme saisonnier. On a distingué dans le cadre du photopériodisme, des plantes de jour long exigeant une certaine durée de la période éclairée, et des plantes de jour court exigeant une certaine durée de la période obscure, parmi lesquelles il faut distinguer des plantes de type « préférantes » ou « atténuées », de celles dont l'exigence en vue de la floraison est absolue (CHOUARD, 1949 *c*) ; chez certaines plantes indifférentes au photopériodisme et à la vernalisation, on a pu mettre en évidence que d'autres facteurs interviennent dans la physiologie du développement, tels que la température, la nutrition minérale (BLONDON, 1964), la nutrition carbonée dont le rôle dans la floraison a été mis en évidence très tôt (KLEBS, 1918 ; KRAUS et KRAYBILL, 1918). L'exposé détaillé des mécanismes régulateurs de la mise à fleur a fait l'objet de nombreux ouvrages (LANG, 1952, 1961 *b*, 1965 ; CHOUARD, 1962 ; TCHAILACHIAN, 1961 ; SALISBURY, 1963).

Sauf dans certains cas de néoténie (CHOUARD, 1951) où elles peuvent fleurir à l'aisselle des cotylédons ou des toutes premières feuilles formées dans l'embryon, les plantes en eupériode et ayant subi la vernalisation ne sont aptes à fleurir qu'après avoir formé un certain nombre de feuilles, qu'après avoir atteint ce qu'on a appelé la maturité de floraison.

Des modifications des substances endogènes de croissance ont été décelées dans les apex au cours de l'induction florale (REINHARD et LANG, 1961 ; HARADA et NITSCH, 1959 ; HARADA, 1962). Les substances extraites de plantes induites ont pu provoquer la floraison de quelques plantes de jour long en dyspériode ou n'ayant pas subi la vernalisation (HARADA, 1960).

De nombreuses substances ont une action sur la mise à fleur ; les plus étudiées sont les auxines et les gibbéréllines. Les auxines peuvent stimuler, ou inhiber la floraison en liaison avec la période d'éclairement [(LANG, 1961). Les gibbéréllines peuvent remplacer chez certaines plantes la vernalisation ou le besoin de jour long (LANG, SANDONAL et BEDRI, 1957 ; TCHAILACHIAN et LOJNIKOVA, 1959 ; MICHNIEWICZ et LANG, 1962 ; PHINNEY et WEST, 1961, etc.).

La floraison *in vitro* des bourgeons néoformés

SKOOG, en 1955, signale la présence d'une petite inflorescence parmi les bourgeons végétatifs obtenus à partir de fragments de tiges végétatives de Tabac cultivar « Wisconsin 38 » *in vitro*, dans un milieu contenant de l'acide α -phénylbutyrique. Ce cas isolé, lui suggère la possibilité d'une induction chimique de la floraison.

Sur ce même matériel, en 1961, CHOUARD et AGHION découvrent que des fleurs isolées peuvent être néoformées directement, sans feuilles ni racines, à partir de fragments de hampe inflorescentielle. La floraison des bourgeons néoformés, obtenue sur un milieu dépourvu de substances de croissance, dépend de la région prélevée sur la plante, et manifeste un gradient axial de propension à fleurir.

En 1964 MOTAMED, au même laboratoire, prospecte les capacités de bourgeonnement de nombreuses plantes, et arrive à obtenir quelques fleurs à partir de tiges inflorescentielles de *Datura Metel*.

L'aptitude à fleurir des bourgeons néoformés à partir des tissus de l'Endive, dont les propriétés organogènes sont bien connues (GAUTHERET, 1941 ; CAMUS, 1949) a été étudiée par plusieurs auteurs. PAULET le premier, en 1964, observe que certains des bourgeons néoformés à partir de fragments de racines vernalisées peuvent fleurir, formant alors un capitule ; il parvient à augmenter le pourcentage de floraison par l'utilisation de certains composés phénoliques.

Des fragments de feuilles d'Endive mis en culture par NITSCH et NITSCH (1964) forment également des bourgeons floraux. MARGARA (1965), de son côté, obtient la néoformation de bourgeons floraux à partir de tiges florifères de la même plante qui manifestent alors un phénomène analogue à celui précédemment décrit chez le Tabac, mais avec un gradient moins net.

Enfin, PIERIK (1965) obtient la floraison *in vitro* des bourgeons néoformés chez une autre plante, le *Lunaria annua*.

Les conditions de la mise à fleur des bourgeons néoformés dans les différents cas cités seront discutées à la fin de ce mémoire.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel : *Nicotiana tabacum* L. (Solanacée)

L'espèce contient sous un seul nom spécifique un grand nombre de variétés, de formes et d'hybrides.

Au cours du développement ontogénique de la plante, ses structures sont modifiées progressivement, puis brutalement au moment de la floraison ; ces modifications, surtout visibles au niveau du point végétatif, sont aussi marquées au niveau des feuilles, des bourgeons axillaires et des entre-nœuds.

LE POINT VÉGÉTATIF

L'étude du point végétatif de *Nicotiana Tabacum* L. aux différentes phases du développement a été reprise récemment par BONNAND (1956, 1959 *a* et *b*). Selon les concepts de PLANTEFOL (1947) et BUVAT (1955) elle distingue trois régions : l'anneau initial, le méristème d'attente, et le méristème médullaire.

Lors de la germination, le point végétatif est constitué par un petit nombre de cellules vacuolisées. On peut distinguer deux assises tunicales et un corpus très réduit.

Du stade 3-5 feuilles au stade 13-15 feuilles la zonation se précise et l'aire apicale s'accroît. A la fin de cette phase, la zonation est très précise, et l'apex a déjà presque atteint la taille qu'il aura à la fin de la période végétative ; pendant cette période les entre-nœuds formés s'allongent peu.

La phase d'élongation est caractérisée par la dédifférenciation de l'ensemble du point végétatif, et le rythme d'apparition des feuilles est accéléré.

Après que la plante ait formé de 30 à 33 feuilles, la zonation disparaît progressivement, les mitoses apparaissent dans la partie apicale axiale du point végétatif, le stade préfloral est atteint. Pendant la phase inflorescentielle les bractées naissent rapidement, toujours à partir de l'anneau initial ; à leur aisselle se développent rapidement de gros bourgeons inflorescentiels dont le développement est de plus en plus rapide ; enfin la région axiale de l'apex central donne une fleur terminale. L'inflorescence se développe en une grappe de cymes.

LES FEUILLES

Selon FARDY, CUZIN et SCHWARTZ (1953) les modalités d'initiation et la croissance de l'ébauche foliaire sont liées à l'état ontogénique de l'apex. La morphologie et la taille de la feuille varient avec le niveau considéré d'insertion. Les feuilles de *Nicotiana Tabacum* sont décurrentes (BONNAND, 1959 *b*) et l'insertion du limbe sur la tige, faible pour les premières feuilles, devient importante, puis négligeable pour les dernières feuilles formées.

Au champ il y a transition nette entre la feuille de cyme et les bractées d'inflorescence ; la taille de ces dernières diminue de la première à la dernière formée. Les bractées florales sont elles-mêmes toujours petites.

Ajoutons ici à titre de remarque que la forme des feuilles est modifiée avec les conditions de culture de la plante.

LES MÉRISTÈMES AXILLAIRES

Selon FARDY, CUZIN et SCHWARTZ (1953) l'évolution cytohistologique des méristèmes axillaires de Tabac est de plus en plus accélérée de bas en haut de la série foliaire, les derniers formés ayant d'emblée la structure préflorale, ce qui selon ces auteurs, va corrélativement avec les « aspects fonctionnels organogènes » de ces méristèmes.

Lorsque le Tabac (cultivar Wisconsin 38) se ramifie après la floraison, on peut distinguer trois régions de l'axe :

La hampe inflorescentielle, région de l'axe située entre la feuille axillant la grappe et la fleur terminale (l'inflorescence est une grappe de cymes à fleur terminale).

La zone de floraison de renfort (MARESQUELLE, 1964) région de l'axe située immédiatement sous l'inflorescence et dont les bourgeons axillaires démarrent consécutivement à la floraison. Au nombre de 2 à 5 environ, les rameaux axillaires fleurissent en ordre descendant, après un nombre de feuilles variables, mais toujours plus grand pour les ramifications inférieures.

La tige végétative dont les bourgeons axillaires ne démarrent pas dans les conditions utilisées.

LES ENTRE-NŒUDS

L'étude ontogénique des tissus de la tige a été faite par ESAÜ (1938) ; retenons la présence de liber interne.

La longueur des entre-nœuds (BONNAND, 1959 *b*) varie avec leur position sur la tige, et l'âge de la plante. Rappelons de plus la différence d'origine des tissus de la tige végétative et des tissus d'un axe inflorescentiel ou d'un pédoncule : « S'il est un organe floral vraiment *sui generis*, sans homologues avec la tige ou les feuilles, c'est bien le pédoncule floral » (BUVAT, 1952, p. 240).

LA FLORAIISON

GARNER et ALLARD (1920) ont découvert le photopériodisme en étudiant la floraison de *Nicotiana Tabacum* variété « Maryland Mammoth » laquelle s'est montrée être de jour court absolue. Depuis on a obtenu des mutants « Mammoth » issus d'autres variétés que « Maryland » ; ce sont aussi des plantes de jour court absolues.

Les nombreuses variétés autres que les « Mammoth » qui composent l'espèce sont de photopériodisme seulement préférant ou neutre. Aucun cas de photopériodisme de type de « jour long absolu » comparable à celui de *Nicotiana sylvestris* ne semble être connu chez *Nicotiana Tabacum* (BOLSUNOV, communication personnelle, 1964).

Parmi les espèces que nous avons cultivées *Nicotiana Tabacum* « xanthi necroticum » est apparu indifférent en serre, *Nicotiana Tabacum* « White Burley » est apparu de jour court préférant, *Nicotiana Tabacum* « Wisconsin 38 » de jour long préférant en serre, est apparu indifférent au photopériodisme dans les conditions du Phytotron décrites plus loin.

LES CAPACITÉS ORGANOGÈNES

Les tissus de *Nicotiana Tabacum* sont remarquables par leur capacité de régénération. Les tiges de Tabac cultivées *in vitro* et les cals repiqués (SKOOG et MILLER,

1957) peuvent, soit proliférer d'une façon inorganisée, soit former des racines, soit former des bourgeons.

De même des organes peuvent se former à partir des tumeurs apparues soit sur les hybrides de *Nicotiana*, soit consécutivement à l'inoculation d'*Agrobacterium tumefaciens* à des Tabacs.

Méthodes

Les techniques utilisées, consistent à provoquer le bourgeonnement des tissus de *Nicotiana Tabacum* cultivar « Wisconsin 38 » (en abrégé « W. 38 ») à partir de régions localisées de l'axe, afin d'observer l'aptitude à la floraison des bourgeons régénérés.

1. Conditions de culture des plantes-mères

Les plantes-mères sont cultivées dans deux sortes de serres appelées « Grandes Serres » et « Superserres », et dans le Phytotron proprement dit.

Les « Grandes Serres » sont des serres normales d'horticulture ; les températures les plus basses enregistrées la nuit y sont de 14 °C, la température de jour étant maintenue à 20 °C. L'été on note des maximums de courte durée de 35 °C, la température de nuit est de 18 à 20 °C. Un éclairage d'appoint continu de 1 500 lux est fourni par des lampes mixtes M.L. ; l'éclairage au niveau des plantes qui atteint 6 000 lux au milieu des journées ensoleillées d'été, est ainsi d'environ 2 500 lux l'hiver à midi.

En hiver la plante forme environ 60 feuilles avant la floraison, alors qu'en été elle en forme 35. Dans tous les cas la tige est mince, les feuilles proximales sèchent et tombent, la hampe est courte. Après floraison la plante se ramifie peu.

Dans les Superserres et le Phytotron, les plantes sont cultivées dans la laine de verre recouverte de vermiculite. La nutrition minérale de la plante est assurée par une solution nutritive (WATERKEIN, MARTENS et NITSCH, 1965).

Dans les Superserres, la luminosité naturelle atteint 10 000 lux en été ; l'hiver, un éclairage fluorescent et incandescent fournit environ 2 500 lux à la surface des feuilles. Les tabacs ont le plus souvent été cultivés en salles chaudes éclairées 16 h par jour ; la température est 30 °C le jour, 20 °C la nuit ; les plantes sont saines, la tige épaisse, les feuilles très vertes, la floraison se fait toute l'année ; le nombre moyen de feuilles est de 30-35. La hampe florale allongée peut atteindre 60 cm en été. C'est avec des plantes cultivées dans ces conditions qu'ont été faites la majorité des expériences.

Dans le Phytotron l'éclairage est donné par des cadres lumineux composés chacun de 16 tubes fluorescents de 125 W « lumière du jour » et de 43 lampes à incandescence de 10 W ; l'éclairage est de 30 000 lux.

Les plantes cultivées en 16 h et 9 h d'éclairage à 22 °C, la température nocturne étant 12 °C ont fleuri simultanément ; elles présentent alors dans ces conditions les caractéristiques de plantes indifférentes au photopériodisme.

2. Techniques conduisant à faire bourgeonner la plante

La néoformation des bourgeons a été obtenue en culture *in vitro* selon la méthode suivante : les tiges récoltées à un moment aussi rapproché que possible de celui de leur utilisation sont débarrassées de leurs feuilles ; frottées au détergent (teepol),

puis rincées, elles sont désinfectées par immersion dans une solution à 7 ou 9 % d'hypochlorite de Calcium (110°) pendant 2 à 20 mn suivant l'âge du tabac et le degré supposé de son infection ; les tiges sont ensuite essuyées entre deux feuilles de papier stérile puis débitées en morceaux. L'ordre de chacun des entre-nœuds est repéré si l'expérience en prévoit la nécessité, et les morceaux provenant de chaque entre-nœud sont placés dans des boîtes de Pétri différentes et marquées ; ou bien au contraire, tous les fragments provenant d'une même région de la tige sont mélangés.

Dans les premières expériences effectuées, les fragments étaient épluchés, l'épiderme et l'écorce rejetés, ce procédé long qui ne s'est pas révélé nécessaire au bourgeonnement n'a pas été maintenu par la suite et l'on s'est contenté de fragmenter l'entre-nœud transversalement en morceaux de 5 à 8 mm. S'il s'agit d'une tige épaisse, chacun de ces morceaux est coupé longitudinalement en 2, voire 4 ou 8 secteurs.

Les fragments sont placés aseptiquement un par un dans chacun des tubes préparés. Ils sont déposés couchés sur la gélose, juste assez enfoncés pour assurer l'adhérence. S'il s'agit de fragments coupés longitudinalement, la surface de section est placée sur la gélose.

Le milieu de base, voisin de celui utilisé par MOREL (1948), est composé des sels minéraux fournis par la solution minérale de KNOP diluée au demi additionnée des oligoéléments de BERTHELOT, de glucose (30 g/l) et des vitamines suivantes : thiamine (1 mg/l), pyridoxine (0,5 mg/l) et acide nicotinique (0,5 mg/l). 20 ml de milieu sont versés dans chaque tube de culture qui mesure 160 × 24 mm. Les tubes sont bouchés soit au moyen de bouchons de verre à fond plat, soit au moyen de bouchons métalliques (aluminium ou acier inoxydable) au fond desquels un tampon de coton assure une protection supplémentaire.

Les tubes de culture ainsi préparés sont autoclavés à 120 °C pendant 20 mn, puis refroidis ; ils sont placés dans la pièce stérile.

Le milieu de base peut faire l'objet de modifications diverses suivant les besoins des expériences.

— soit par modification des concentrations de glucides,

— soit par adjonction de substances de croissance : kinétine, auxine, acide gibbérellique. Les solutions aqueuses contenant ces substances sont ajoutées au milieu de culture et autoclavées avec celui-ci.

Il est d'usage courant d'autoclaver l'auxine et la kinétine ; pour l'acide gibbérellique, des expériences comparatives de stérilisation ont été effectuées par MOTAMED (1964) qui a trouvé, sur le même matériel, une activité équivalente de cette substance stérilisée par autoclavage ou par d'autres méthodes.

Après ensemencement, les tubes sont portés sur des étagères éclairées. Deux dispositifs ont été utilisés, l'un donnant les conditions photopériodiques dites de jour long (16 h d'éclairement par jour), l'autre les conditions photopériodiques de jour court (9 h d'éclairement par jour).

Ces dispositifs sont constitués chacun de 5 étagères superposées de 1,20 m sur 0,60 m. Les cadres lumineux sont composés de 6 tubes fluorescents de 40 W « Blanc Super », et de 18 lampes à incandescence de 10 W. L'éclairement reçu à la surface de la gélose est de 5 000 lux environ. Les deux armoires sont dans la même pièce ; la température est réglée par un dispositif de contrôle placé sur une des étagères. Les températures minimales et maximales enregistrées dans l'année sont 20 ± 2 °C la nuit et 28 ± 2 °C le jour. L'obscurcissement des armoires pendant les périodes

de nuit se fait par la descente automatique d'un rideau entourant complètement chaque armoire.

L'obscurité continue est obtenue en plaçant les paniers de culture sur l'étagère supérieure des armoires qui n'est pas éclairée et qui est obscurcie par le rideau. Les paniers sont en outre enveloppés dans des étoffes noires et blanches.

Une expérience comparative de bourgeonnement *in vivo* a été faite en utilisant la technique d'inoculation d'*Agrobacterium tumefaciens* : la souche T₃- maintenue en état de vie active par des repiquages fréquents a été inoculée aux entre-nœuds de plantes fleuries de *Nicotiana Tabacum* « W. 38 ».

3. Méthodes d'observation

1. REPIQUAGE EN SERRE

L'idée première était de repiquer en serre les bourgeons formés dans les tubes de culture, puis de comparer les délais de floraison de ces bourgeons avec la floraison des plantes provenant de semis, cultivées dans les mêmes conditions.

Ce procédé est apparu trop lent, et demandait trop de place, puis est devenu sinon inutile, du moins secondaire lorsque nous sommes parvenue à obtenir la floraison des bourgeons dans les tubes mêmes.

2. OBSERVATIONS A LA LOUPE BINOCULAIRE

Nous nous sommes alors limitée à l'étude de l'aptitude à la floraison manifestée par des bourgeons néoformés après une période de 45 jours de culture *in vitro*. Pour cela, en fin de culture, chaque fragment de hampe est sorti du tube et placé sous la loupe binoculaire, afin d'examiner l'apex de chaque bourgeon.

Un apex est considéré comme étant floral lorsque, gros et bombé, il a au minimum formé les 5 ébauches des sépales ; cette détermination rapide de la floraison a été nécessitée par le grand nombre d'apex à examiner.

Nous avons appelé « bouton floral » ou « fleur » une pousse dont la « floraison » ainsi déterminée n'a été précédée par la formation d'aucune feuille. Certains boutons sont alors insérés directement sur le cal ; les plus nombreux sont formés d'un petit axe muni de 1 à 3 bractées et d'une fleur terminale unique ; cependant des groupements de plusieurs boutons sur un même axe ont pu être observés. Le terme « bourgeon floral » a été réservé à des systèmes caulinaires feuillés dont l'apex est floral ; parmi ceux-ci il a été distingué sous la dénomination système « Tige-feuille-Fleur » des formations ayant une allure caractéristique décrite ultérieurement.

Enfin a été appelé « bourgeon végétatif » tout système caulinaire feuillé dont l'apex n'est pas floral.

Le nombre des boutons ou des bourgeons floraux est compté sur chaque fragment ; lorsque les boutons sont développés, un examen des pièces florales est fait ; l'examen est complété par une brève annotation morphologique. Ce travail étant consacré spécialement au virage floral, il se trouve que le nombre des bourgeons végétatifs formés sur les fragments n'a pas toujours été compté et ne figure pas dans les tableaux, mais l'observation qui en a été faite est indiquée dans le texte.

3. OBSERVATIONS HISTOLOGIQUES

L'observation des néoformations à la loupe binoculaire a été complétée dans certains cas par l'étude histologique des apex néoformés. La structure des apex

en fin de culture a été comparée à la structure de l'apex de *Nicotiana Tabacum* dont l'évolution au cours de l'ontogenèse a été étudiée par BONNAND (1959 *b*). Une technique classique d'histologie a été utilisée. Les bourgeons prélevés sont fixés dans le fixateur FAA (FAA : formol commercial 35° : 5 ml ; acide acétique : 5 ml, alcool éthylique à 70° : 90 ml) ; ils sont colorés soit à l'hématoxyline de Regaud, soit au vert de méthyle pyronine qui sert au test de BRACHET.

L'étude des étapes de la néoformation a nécessité l'utilisation de coupes histologiques passant par le fragment initial et le cal en voie de prolifération. La technique a été inspirée de celle que GAUTHERET (1953) préconise pour l'étude histologique des cultures de tissus végétaux ; quelques modifications y ont été apportées. Les régions à étudier des fragments prélevés à des temps échelonnés, sont fixées dans le FAA ; après déshydratation, l'imprégnation progressive des tissus est faite dans la paraffine fondant à 46-48 °C ou 51-53 °C. La coloration est faite le plus souvent à l'hématoxyline de Regaud et au rouge de Ruthénium. Les coupes sont d'épaisseur variable selon les cas (8 μ à 15 μ). Des difficultés ont été rencontrées provenant d'une part de ce que les objets à déliter comportent à la fois du bois, de grandes cellules parenchymateuses et des îlots de cellules méristématiques, et, d'autre part, de ce que les méristèmes en voie de formation sont situés à l'intérieur du cal ; ce dernier fait a rendu nécessaire un grand nombre de coupes.

PREMIÈRE PARTIE

MISE EN ÉVIDENCE D'UN GRADIENT DE FLORAISON LE LONG DE L'AXE DE LA TIGE

Le but de cette première partie est de définir expérimentalement si l'aptitude à la néoformation des bourgeons plus ou moins rapidement ou directement florifères est possédée également, indifféremment ou de façon graduée, à tous les niveaux de la tige de Tabac de quelques races ou espèces voisines, en culture *in vitro* ou sur la plante entière.

Afin d'obtenir des résultats comparables, le même milieu de culture, la même technique, sont employés dans tous les cas. Ainsi les différences observées sont-elles d'origine endogène et caractéristiques d'un site morphologique, d'un âge, d'une race, d'une espèce.

I. — APTITUDE A FLEURIR DES BOURGEONS NÉOFORMÉS CHEZ *NICOTIANA TABACUM* « WISCONSIN 38 »

A. Gradient d'aptitude à la floraison des bourgeons néoformés sur des fragments d'entre-nœuds cultivés *in vitro*.

Le gradient d'aptitude à la floraison des bourgeons néoformés a été mis en évidence, grâce à l'utilisation de la méthode de culture *in vitro* des fragments d'orga-

nes. La plante étudiée *Nicotiana Tabacum* cultivar « Wiconsin 38 » (en abrégé « W. 38 ») est celle précisément utilisée par SKOOG dans son étude sur les facteurs du bourgeonnement *in vitro*. C'est donc un matériel dont les propriétés organogènes sont bien connues.

Le milieu de culture utilisé dans ces expériences est le milieu dit « de base » dépourvu de substances de croissance ; les facteurs de l'environnement sont maintenus aussi constants que possible. Les seuls facteurs introduisant une variation sont les conditions d'élevage des plantes mères, les régions de l'axe d'où proviennent les fragments d'entre-nœuds ensemencés, l'âge des plantes utilisées. Plusieurs expériences ont été réalisées ; quelques-unes seulement seront mentionnées parmi les plus caractéristiques.

A₁) Exploration des entre-nœuds des plantes fleuries

Les plantes ont toutes été prélevées lorsque l'inflorescence est allongée, la fleur terminale première formée étant déjà en capsule, le reste de la sommité florale en cours de floraison.

Les nœuds ont été comptés à partir de la base de la plante, car les expériences portent sur des plantes fleuries après un nombre variable de feuilles (pour cela les nœuds enfouis par les rempotages ont été déterrés).

Trois régions de la plante ont été distinguées ; la hampe inflorescentielle, la sous-hampe comportant les deux ou trois entre-nœuds situés immédiatement sous l'inflorescence, et la tige, région sous-jacente de l'axe. Les fragments provenant de chaque entre-nœud ou de chacune des trois régions de l'axe de la plante sont groupés dans des boîtes de Pétri numérotées, avant d'être répartis dans les tubes de culture eux-mêmes répertoriés.

PREMIÈRE SÉRIE D'OBSERVATIONS

Méthode expérimentale

Les cultures sont faites avec des entre-nœuds prélevés sur des plantes cultivées l'hiver dans les « Grandes Serres », fleuries après avoir formé 60 feuilles. Comme il avait été constaté dans les toutes premières expériences que les entre-nœuds proximaux sont infectés ou ne réagissent pas en culture *in vitro*, seules sont prélevées les portions distales des tiges.

Les 15 entre-nœuds terminaux de trois plantes sont prélevés, de l'entre-nœud 49 à l'entre-nœud 64, sous-jacent à la fleur terminale ; les fragments sont répartis en 3 groupes selon les trois régions que l'on distingue sur la plante entière, hampe, sous-hampe et tige ; 20 fragments de hampe, 20 fragments de sous-hampe et 20 fragments de tige sont ensemencés.

Simultanément un semis est fait en serre.

Les cultures aseptiques sont observées 2 mois plus tard ; les fragments sont sortis des tubes et observés à l'œil nu, puis les bourgeons feuillés néoformés sont repiqués en serre de la manière suivante : 10 bourgeons feuillés provenant de chacune des trois régions de la tige sont prélevés avec un peu de cal ; ils sont repiqués en serre sur sable à « l'étouffée » de façon à provoquer l'enracinement, puis repiqués sur le sol habituel utilisé dans ces serres, soit le mélange : 2/3 de terreau + 1/3 de sable.

Les bourgeons sont placés dans les mêmes conditions que les plantes du semis fait en début d'expérience ; ils sont laissés en expérimentation jusqu'à la floraison.

Résultats

Les plantes provenant du semis fait en serre ont fleuri au bout de 6 mois après avoir formé un grand nombre de feuilles. Après 2 mois de culture *in vitro* tous les fragments ont produit un cal au pôle proximal à partir duquel des bourgeons se sont formés. Tous ne sont pas identiques ; leur aspect diffère suivant la région prélevée.

La plupart des bourgeons formés sur les fragments de hampe ont fleuri dans les tubes mêmes, révélant ainsi une très précoce aptitude à la floraison. Les néoformations sont composées d'un axe mince et allongé sur lequel sont insérées une ou plusieurs écailles dont l'aspect rappelle celui des bractées du Tabac ; l'axe est terminé par un bouton floral dont la longueur peut atteindre 0,5 à 1 cm (Pl. II, 2). Les boutons sont au nombre de 1 à 4 par fragment. Les quelques bourgeons végétatifs formés, repiqués en serre, ont fleuri en même temps que les plantes du semis fait en début d'expérience, soit après plusieurs mois.

Aucune différence n'est observée entre les cultures faites avec les fragments de sous-hampe et de tige ; aucun bourgeon n'a fleuri dans les tubes de culture. Ces bourgeons néoformés, repiqués en serre, n'ont pas fleuri plus rapidement que les plantes provenant de semis ; cependant un des bourgeons provenant de la région sous-inflorescentielle a fleuri plus vite, un mois et demi après le repiquage, et consécutivement à la formation d'une dizaine de feuilles seulement (Pl. I, 2).

Il a donc été possible d'obtenir une mise à fleur accélérée des bourgeons néoformés sur des fragments de tige de Tabac, la floraison ayant lieu dans le tube même de culture. Cette mise à fleur apparaît liée au lieu d'origine du fragment prélevé sur la tige de Tabac fleuri, sans qu'intervienne aucune modification des facteurs du milieu et sans que, dans les conditions de la culture *in vitro*, la formation de racines soit nécessaire.

DEUXIÈME SÉRIE D'OBSERVATIONS

Méthode expérimentale

Les 15 entre-nœuds terminaux prélevés sur 2 plantes analogues fleuries à la fin de l'hiver après avoir formé 56 feuilles, sont répartis en trois groupes :

- 20 tubes de fragments de hampe,
- 20 tubes de fragments de sous-hampe,
- 20 tubes de fragments de tige.

L'expérience a été arrêtée après 45 jours. L'observation macroscopique a été complétée par l'observation et la dissection des bourgeons néoformés sous la loupe binoculaire ; la floraison ultérieure en serre des bourgeons végétatifs néoformés n'a pas été suivie.

Résultats

Comme dans la première expérience, les bourgeons formés à partir des fragments de hampe ont fleuri très précocement sans former de feuilles, ils sont appelés simplement boutons. Disséqué, chaque bouton apparaît composé de 5 sépales,

5 pétales, 5 étamines, 2 carpelles ; il n'a pas été observé dans cette expérience de boutons anormaux. L'observation à la loupe permet de déceler de jeunes boutons non visibles à l'œil nu, portant à 6 le nombre maximum de boutons observés sur un cal. Sur chaque cal un bouton se développe ; le pédoncule s'allonge, le bouton peut atteindre 1 cm et plus, taille normale des boutons du Tabac ; les autres boutons sont petits mais bien individualisés ; ils se dessèchent sans se développer davantage si les fragments sont laissés en expérience plusieurs mois.

Sur les fragments de sous-hampe et de tige, deux types de bourgeons feuillés ont été observés : les uns à la tige peu développée presque en rosette, aux feuilles bien vertes et larges comme celle des Tabacs en serre (bien que demeurant petites), peuvent être représentés par la photo Pl. II, 3. L'observation à la loupe montre que les apex sont végétatifs, envahis par des poils, difficiles à disséquer, petits et de forme triangulaire.

Les autres, plus rares, ont une tige épaisse plus développée, des feuilles moins vertes, plus épaisses, moins larges. Les apex sont des boutons toujours petits, ils n'évoluent pas et se dessèchent. Les boutons sont cachés par les feuilles de la petite tige ; celles-ci sont au nombre de 6 à 10 environ. L'aspect caractéristique de ces jeunes pousses (Pl. II, 4) nous a conduit à les appeler « système Tige-feuille-Fleur » soit en abrégé Tff. Ils ont toujours été observés sur des fragments de tige.

A la suite de ces deux premières séries d'observations (plusieurs expériences faites avec des plantes cultivées dans les mêmes conditions ont donné des résultats identiques) on peut opposer deux régions de l'axe du Tabac qui se comportent en culture *in vitro* de façon différente :

— la hampe florale dont les entre-nœuds forment des bourgeons qui fleurissent *in vitro* sans feuilles,

— la tige dont les entre-nœuds produisent des bourgeons feuillés, qui, repiqués en serre, ne fleurissent pas plus vite que les plantes de semis ; il faut signaler cependant que certains d'entre eux, d'aspect caractéristique, fleurissent dans les tubes de culture, nous les avons appelés des systèmes Tige-feuille-Fleur.

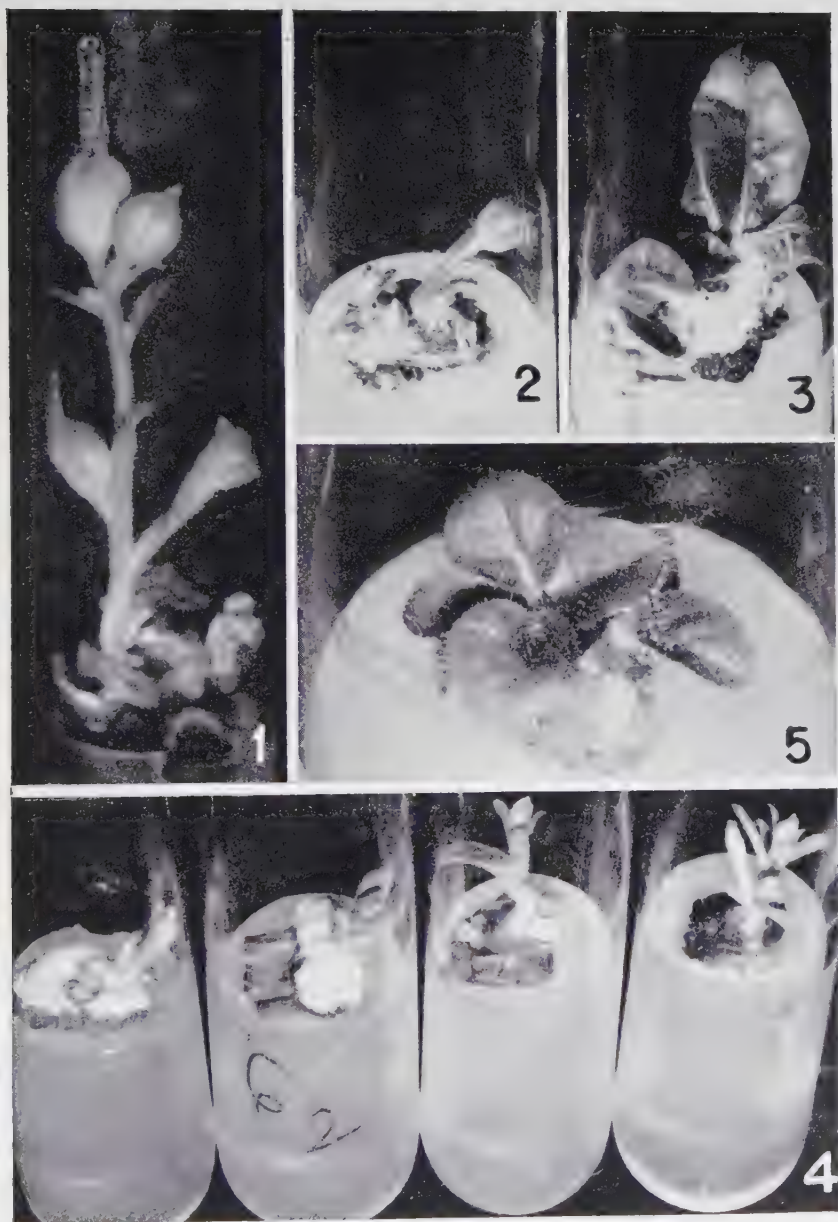
TROISIÈME SÉRIE D'OBSERVATIONS

Méthode expérimentale

Les plantes utilisées ont été récoltées aux « Grandes Serres » en été. Ce lot de plantes a formé seulement 30 à 35 feuilles avant de fleurir. L'axe de l'inflorescence est épais, les entre-nœuds sont longs, la fructification abondante.

PLANCHE II. — Aspect des bourgeons de *Nicotiana Tabacum* « Wisconsin 38 » néoformés *in vitro*.

1. — Petite inflorescence néoformée sur fragment de sous-hampe.
2. — Bouton floral néoformé sur fragment de hampe.
3. — Bourgeon végétatif néoformé sur fragment de tige.
4. — Systèmes « Tige - feuille - Fleur » néoformés sur fragments de tige.
5. — Bourgeon néoformé sur fragment de tige de jeune plante.



Les 10 entre-nœuds terminaux de trois plantes analogues sont répartis comme précédemment :

Nombre de tubes	Région prélevée	Entre-nœuds correspondants
20	hampe	EN 35 à EN 30
20	sous-hampe	EN 29 à EN 28
20	tige	EN 27 à EN 25

Les explantats ont été examinés sous la loupe binoculaire après 7 semaines de culture.

Résultats

Dans cette expérience faite en été, on a pu compter jusqu'à 10 boutons par fragment de hampe.

Sur les fragments de sous-hampe des bourgeons floraux comprenant de une à trois feuilles larges se sont développés. Des petites inflorescences ont pu être observées (Pl. II, 1). Certains boutons ont grossi ; les pétales et le style se sont allongés sans toutefois atteindre l'épanouissement total.

Sur les fragments de tige des bourgeons feuillés se sont formés parmi lesquels un système « Tff » d'allure caractéristique sur l'entre-nœud 27.

Nous constatons pour cette expérience faite avec des plantes d'été :

1° que l'aptitude à la floraison est supérieure lorsque les fragments sont prélevés sur des plantes vigoureuses à floraison abondante.

2° que le comportement des fragments en culture permet de retrouver les trois régions, hampe, sous-hampe et tige, déterminées sur la plante entière. De la sorte, il n'y a plus opposition entre le comportement de deux régions de l'axe de la plante mais passage graduel de l'une à l'autre, avec une aptitude croissante à la floraison des bourgeons néoformés, qui suggère la notion de gradient physiologique développée par PRAT (1945).

QUATRIÈME SÉRIE D'OBSERVATIONS

Méthode expérimentale

Les fragments sont prélevés sur des plantes fleuries cultivées au Phytotron dans un compartiment dont la température est continuellement 17 °C. La durée journalière d'éclairement est de 16 h (lumière intense de 30 000 lux). Tous les entre-nœuds des plantes sont mis en culture depuis l'entre-nœud 8 jusqu'à l'entre-nœud 26 terminal. Les fragments provenant de chaque entre-nœud sont repérés.

Les cultures sont examinées 45 jours après l'ensemencement ; en raison du comportement des fragments, deux régions ont été distinguées dans la partie appelée habituellement tige, ce qui porte à quatre les subdivisions de l'axe. Sur chaque fragment, les bourgeons végétatifs et les bourgeons floraux ont été comptés. Selon chaque région, le nombre moyen de bourgeons par fragment (floraux plus végétatifs) a été compté ainsi que le nombre moyen des bourgeons végétatifs et des bourgeons floraux. Les résultats sont portés sur le tableau I.

TABLEAU I

Nombre de bourgeons formés sur les fragments prélevés à partir de différentes régions de l'axe de Tabacs fleuris

Région	Tige		Sous-hampe	Hampe
Entre-nœud	8 ^e au 16 ^e	17 ^e et 18 ^e	19 ^e et 20 ^e	21 ^e au 26 ^e
Nombre de fragments	38	10	12	11
Nombre bourgeons végétatifs	10	29	25	5
Nombre bourgeons floraux	6 Tff	2 Tff	28	67
Nombre bourgeons végétatifs par fragment	0,25	2,9	2	0,2
Nombre bourgeons floraux par fragment	0,15 Tff	0,5 Tff	2,3	6
Nombre bourgeons végétatifs et floraux par fragment	0,40	3,4	4,3	6,2

Les résultats concernant l'aptitude à la floraison des bourgeons néoformés sont analogues à ceux obtenus dans l'expérience précédente. Des Tff se sont formés aux entre-nœuds 8, 9, 12, 13 et 17 ; les boutons floraux sont déjà nombreux sur la sous-hampe.

A ces observations s'ajoutent des résultats numériques. Le nombre moyen de bourgeons floraux par fragment (Tff ou boutons floraux selon les régions) est plus élevé lorsque les fragments sont prélevés sur des régions plus distales de l'axe du Tabac.

Le nombre moyen du total des bourgeons floraux et végétatifs formés par fragment suit la même progression.

Le nombre moyen de bourgeons végétatifs formés augmente avec la hauteur du prélèvement sur la tige, puis diminue lorsque les fragments sont prélevés sur la sous-hampe et la hampe, corrélativement à l'augmentation du nombre de boutons.

Cette dernière série d'observations complète les trois précédentes en apportant des résultats quantitatifs. Au gradient d'aptitude à la floraison des bourgeons néoformés, caractérisé par la précocité de floraison de ces bourgeons, s'ajoute un gradient numérique : le nombre moyen de bourgeons floraux formés par fragment augmente, selon le niveau de prélèvement, des régions proximales aux régions distales de l'axe des plantes fleuries. L'analyse de ce gradient n'a pas été poursuivie à l'intérieur même de la région inflorescentielle de l'axe qui a été considérée globalement.

Dans les conditions de culture, le même gradient numérique affecte l'organogénèse caulinaire générale (nombre de bourgeons formés, floraux ou non).

A2) Exploration des entre-nœuds subterminaux de plantes d'âges divers

L'expérience décrite a été faite avec des plantes cultivées dans les « Grandes Serres », l'hiver, et qui forment alors 60 à 70 feuilles avant de fleurir. Trois lot de plantes ont été semées à des temps échelonnés.

Les plantes sont prélevées alors que leur croissance n'est pas terminée. Des

expériences préliminaires ont montré que, d'une part les entre-nœuds les plus proches de l'apex n'ayant pas atteint le diamètre ni l'allongement définitif sont très fragiles et réagissent mal en culture ; d'autre part, les entre-nœuds prélevés sur les régions proximales de la tige de ces plantes, région où les feuilles jaunies tombent, réagissent peu ; les fragments forment seulement un cal. Ces deux régions extrêmes ont été supprimées. Les 10 ou 15 entre-nœuds subterminaux prélevés correspondent à la région où la tige est épaisse et les feuilles bien vertes et étalées.

Les entre-nœuds mis en culture sont prélevés sur des plantes d'âge différent c'est-à-dire ayant formé un nombre plus ou moins grand de feuilles, mais ils correspondent à des régions de croissance équivalentes par rapport à l'apex.

Premier lot : jeunes plantes. Dans ce premier cas des graines de *Nicotiana Tabacum* « W.38 » ont été stérilisées dans l'hypochlorite à 3,5 % pendant 40 minutes, puis rincées à l'eau stérile ; elles ont ensuite été ensemencées sur un milieu gélosé habituel mais ne contenant que 5 g par litre de glucose. Les jeunes plantes aseptiques ainsi obtenues ont été prélevées alors qu'elles avaient 7 feuilles étalées, plus étiolées que dans le cas de semis faits aux serres. Un ou deux entre-nœuds ont pu être prélevés par plante, environ les 4^e et 5^e ; 40 tubes ont été ensemencés.

Deuxième lot : plantes végétatives de 37 feuilles ; 8 entre-nœuds non allongés sont supprimés dans la région apicale. Les entre-nœuds sont prélevés du 16^e au 29^e nœud. 110 fragments sont mis en culture.

Troisième lot : plante adulte de 60 feuilles ; 12 entre-nœuds non allongés sont supprimés avec l'apex végétatif. Les entre-nœuds sont prélevés du 27^e au 49^e. 53 tubes sont ensemencés.

Quatrième lot : plante en boutons, hampe non allongée de 5 entre-nœuds, 67 feuilles. 10 entre-nœuds dont ceux de l'inflorescence sont supprimés ; les entre-nœuds sont prélevés du 51^e au 62^e ; 40 fragments sont mis en culture.

Les résultats sont indiqués dans le Tableau II.

TABLEAU II

Bourgeons floraux néoformés sur les fragments provenant d'entre-nœuds subterminaux de plantes d'âge différent.

Age plante	Jeunes plantes	Plante végétative	Plante adulte	Plante en boutons
Entre-nœuds	4 ^e et 5 ^e	16 ^e à 29 ^e	27 ^e à 49 ^e	51 ^e à 62 ^e
Nombre tubes	40	110	53	40
Nombre bourgeons floraux ..	0	3 Tff	4 Tff	6 Tff
Moyenne bourgeons floraux par fragment	0	0,03	0,09	0,15

Certains entre-nœuds de jeunes plantes ont réagi en se transformant complètement en un cal aux grandes cellules, puis sont apparus des bourgeons néoformés. Ils ont des feuilles pétioolées, leur aspect rappelle celui des plantules (Pl. II, 5). Il n'a pas été observé de boutons floraux.

Les fragments provenant des entre-nœuds prélevés sur les plantes plus âgées cultivées en serre, ont formé un cal au pôle basal et des bourgeons végétatifs analogues à ceux néoformés à partir de la région tige des plantes fleuries. Parmi les bour-

geons végétatifs formés, des systèmes caractéristiques Tff ont été observés à partir du 20^e nœud.

Les fragments d'entre-nœuds subterminaux de plantes d'âge divers n'ayant pas terminé leur croissance forment des bourgeons pour la plupart végétatifs. Cependant quelques systèmes feuillés ont fleuri en tubes avec l'aspect caractéristique des Tff. Ces bourgeons floraux sont peu fréquents, leur nombre est plus élevé lorsque la plante est plus âgée.

A₃) Conclusion

Trois faits principaux se dégagent de ce premier chapitre :

1) *Isolés de la plante, cultivés in vitro, des fragments d'entre-nœuds de Tabac « W.38 » prélevés à des niveaux différents de la tige manifestent des comportements différents.*

Les fragments forment tous un cal et des bourgeons, mais selon le niveau de prélèvement et selon la maturité de la plante, les bourgeons néoformés manifestent diverses potentialités d'aptitude à la floraison (AGHION 1963).

Il s'ensuit que selon le niveau de prélèvement des fragments, les bourgeons néoformés ont un aspect différent qui traduit une aptitude plus ou moins précoce à la floraison.

— Les fragments prélevés sur la hampe inflorescentielle donnent des bourgeons très précocement fleuris, réduits même aux organes inflorescentiels : boutons, bractées, axe inflorescentiel ou floral.

— Les fragments prélevés sur la région de l'axe située immédiatement sous l'inflorescence donnent des bourgeons qui peuvent aussi fleurir plus ou moins précocement, soit dans le tube, soit plus tard en serre.

— Les fragments prélevés sur la région feuillée de la tige de Tabacs fleuris ou non forment des bourgeons végétatifs qui, repiqués en serre, fleurissent au bout de plusieurs mois après avoir formé de nombreuses feuilles.

Certains des bourgeons néoformés peuvent cependant fleurir en tube après avoir formé quelques feuilles et présentent alors un aspect caractéristique appelé ici Tff.

2^o *Le comportement des fragments des entre-nœuds de Tabac « W.38 » traduit un gradient de floraison.*

Ce gradient est exprimé par l'aptitude à fleurir plus ou moins précoce des bourgeons néoformés (nombre de feuilles précédant la floraison et développement plus ou moins complet des fleurs), mais aussi par le nombre de bourgeons floraux formés, croissant avec le niveau plus élevé de prélèvement des entre-nœuds et avec la maturité des plantes.

Au gradient de floraison se superpose un gradient d'organogenèse caulinaire affectant la totalité des bourgeons néoformés qu'ils soient végétatifs ou floraux.

Le gradient est plus ou moins continu, toujours existant, mais affecté par les conditions d'élevage des plantes-mères (vigueur).

Le gradient est lié à l'ontogenèse normale de la plante. Les trois régions distinguées sur la plante entière : zone inflorescentielle, zone de floraison de renfort, tige végétative, se retrouvent dans le comportement différent des fragments issus de ces trois régions.

3° La floraison des bourgeons néoformés *in vitro*, dans le cas extrême où ne se forment que les organes floraux est, en soi, un phénomène à dégager. Il sera étudié dans la deuxième partie de notre exposé.

B. Gradient d'aptitude à la floraison des bourgeons néoformés sur la plante entière.

Le gradient d'organogenèse florale observé sur les fragments d'entre-nœuds de Tabac « W.38 » cultivés *in vitro*, s'il résulte d'une différence physiologique, d'un gradient existant dans la plante entière, doit se manifester aussi lorsque les phénomènes d'organogenèse se manifestent *in vivo*, c'est-à-dire sur la plante entière.

Le problème consiste alors à induire la prolifération cellulaire *in vivo* de telle sorte que les tissus néoformés s'organisent en bourgeon, à provoquer ces néoformations à différents niveaux de la tige, sur les entre-nœuds des plantes fleuries ; enfin à observer l'aptitude à l'organogenèse des tissus néoformés et l'aptitude à la floraison des bourgeons.

Le moyen expérimental choisi est de provoquer chez *Nicotiana Tabacum* « W.38 » la formation de tumeurs de crown-gall pour les raisons suivantes :

- Dans certaines conditions les tumeurs induites par certaines souches d'*Agrobacterium tumefaciens* s'organisent (BRAUN, 1953).
- l'organogenèse des tératomes est sensible au milieu hormonal (STONIER, 1962).
- les organes néoformés sur les tumeurs internodales se forment à partir des cellules de la tumeur (LEVINE, 1923), ces bourgeons sont néoformés *in vivo* par les mêmes processus que ceux néoformés *in vitro* (BUVAT, 1944).
- les bourgeons formés à partir de cellules de crown-gall peuvent fleurir (BRAUN, 1959 et STONIER, communication personnelle, 1964).
- par rapprochement aussi avec le fait que les tumeurs qui se forment sur la hampe florale des hybrides génétiques de *Nicotiana* se couvrent de méristèmes qui sont parfois floraux (IZARD, 1952). Des graines viables peuvent être obtenues à partir de fleurs nées sur les tumeurs (SMITH, 1962).

Méthode expérimentale

La souche T 37 d'*Agrobacterium tumefaciens* a été utilisée. La bactérie semi-virulente est inoculée de deux manières aux plantes fleuries :

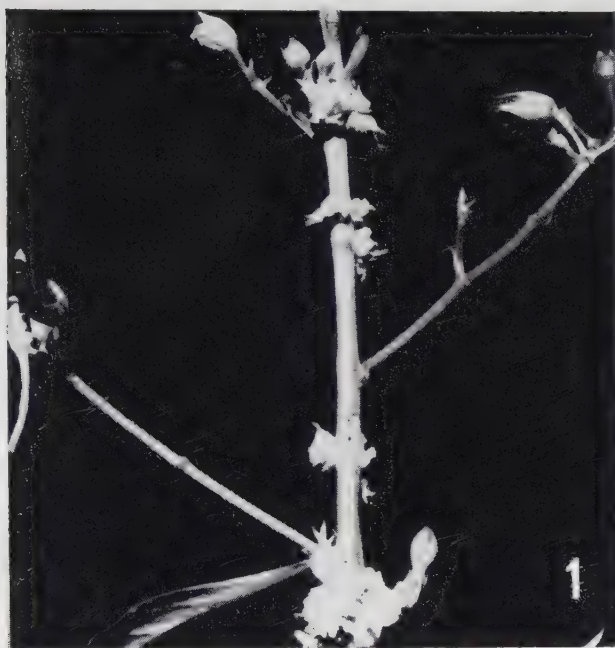
- a) la bactérie est inoculée selon la méthode ordinaire, à des plantes décapitées. Les plantes sont décapitées à différents niveaux.
- b) La bactérie est inoculée dans les entre-nœuds de plantes entières fleuries, à différents niveaux de l'axe.

Résultats

- a) Souche T 37 inoculée à la surface de décapitation de plantes fleuries.

PLANCHE III. — Boutons néoformés sur des tumeurs.

1. — Boutons sur crown-gall de hampe de « W. 38 » *in vivo*.
2. — Boutons sur fragment de hampe de *Nicotiana glauca* × *Langsdorffii* *in vitro*.



Seules les plantes décapitées au niveau d'un entre-nœud d'une région feuillée de l'axe, ont proliféré. De gros tératomes se sont formés à la surface d'inoculation.

b) Souche T 37 inoculée aux entre-nœuds de plantes fleuries.

Des tumeurs se sont développées et organisées aux sites d'inoculation. La nature de l'organisation dépend du niveau sur la tige de l'entre-nœud inoculé.

— Sur la hampe inflorescentielle des petites tumeurs se sont développées et portent des bourgeons dont certains sont rapidement floraux. Ils ont l'aspect des boutons formés *in vitro* sur les fragments provenant des entre-nœuds de la même région inflorescentielle de l'axe (Pl. III, 1).

— Sur la région sous-inflorescentielle, à partir des tumeurs se sont développés de petits axes caulinaires qui ont formé quelques feuilles puis ont fleuri.

— Sur la tige, dans les régions immédiatement sous-jacentes, il a été observé que quelques tumeurs forment parfois des organoïdes tératologiques ; plus bas sur la tige les tumeurs sont inorganisées.

Ces résultats sont à rapprocher de ceux auxquels nous avait conduite l'observation du comportement des fragments de tige en culture *in vitro* ; le gradient de floraison exprimé normalement par les bourgeons axillaires d'origine superficielle, est retrouvé lorsque les bourgeons sont néoformés à partir de la prolifération cellulaire induite sur les entre-nœuds de la plante entière ; il trouve sa plus remarquable expression *in vivo* comme *in vitro* dans la néoformation directe de boutons floraux sur les tissus induits à proliférer, à partir de l'axe inflorescentiel du Tabac « W.38 ».

II — APTITUDE A FLEURIR DES BOURGEONS NÉOFORMÉS CHEZ LE TABAC ET QUELQUES AUTRES ESPÈCES DE NICOTIANA

Le gradient de prédisposition à la floraison d'une part, la néoformation de bourgeons immédiatement inflorescentiels, d'autre part, sont-ils caractéristiques de la variété de Tabac étudiée, ou sont-ils la manifestation d'un phénomène plus général ? Une esquisse d'investigation dans ce domaine a été réalisée d'abord au sein de l'espèce *Nicotiana Tabacum*, puis étendue à quelques membres du genre *Nicotiana* ayant la capacité de bourgeonner *in vitro*.

MÉTHODE EXPÉRIMENTALE

Des fragments d'entre-nœuds sont prélevés sur des plantes fleuries, et cultivés *in vitro* sur le milieu de base.

Pour une grande partie, les expériences ont été faites lors d'un séjour à l'Institut National des Tabacs de Bergerac, où une collection vivante de nombreuses variétés de Tabacs et d'espèces de *Nicotiana* a été mise à notre disposition. 1200 tubes ont été ensemencés avec plus de 20 espèces et variétés ; malgré les précautions accrues de désinfection, de nombreuses plantes ont été éliminées par les infections systématiques, notamment parmi les espèces des sous-genres *Rustica* et *Petunioides*.

Lorsque les plantes sont cultivées à Gif, les entre-nœuds sont prélevés sur les régions inflorescentielles et végétatives de la tige des plantes fleuries.

Les tubes de culture sont en général placés sur les étagères éclairées 16 h par jour. Les cultures provenant de plantes connues pour avoir un besoin photopério-

dique absolu, sont placées sur des étagères éclairées en eupériode et aussi en dyspériode.

MATÉRIEL

Le genre *Nicotiana* est subdivisé en 3 sous-genres (GOODSPEED, 1954) les sous-genres *Tabacum*, *Rustica*, *Petunioides*. Les tiges de toutes les espèces n'ont pas la capacité de bourgeonner spontanément *in vitro* (LEVINE, 1950) ce qui limite le choix du matériel. Les plantes citées ci-dessous ont été expérimentées.

— Sous - genre *Tabacum*.

Section *Genuinae*. Espèce *Nicotiana Tabacum*.

15 variétés ont été cultivées, dont 3 sont des mutants « *Mammoth* ». Parmi les 12 autres citons pour leurs particularités *Nicotiana Tabacum* « *White Burley* » plante pauvre en chlorophylle, et *Nicotiana Tabacum* « *lacerata* » dont la fleur présente la particularité d'être dépourvue de sépales.

Section *Tomentosae*. Espèce *tomentosiformis*, plante subarborescente de jour court.

— Sous-genre *Petunioides*.

Espèce *Nicotiana suaveolens*, plante herbacée buissonnante, dépourvue d'axe principal, bourgeonne aisément *in vitro* (PAULET et NITSCH, 1963).

Espèce *Nicotiana sylvestris*, plante de jour long absolue, elle demeure en rosette en jour court.

— Sous-genre *Rustica*.

les espèces cultivées, ou n'ont pas réagi, ou ont été infectées.

— Hybrides tumoraux.

Nicotiana glauca Graham $\times$ *Nicotiana Langsdorffii* Shranck a été expérimenté ; c'est le plus connu des hybrides de *Nicotiana* ayant la faculté de former spontanément des tumeurs *in vivo* ; c'est à partir de cette plante que WHITE (1939) a obtenu la culture indéfinie des tissus.

RÉSULTATS

Les résultats sont groupés dans le tableau III. Les plantes qui présentent un gradient très net comme celui décrit chez « W.38 » sont représentées par le symbole ++, celles qui présentent un gradient moins net, mais toujours la capacité de former des bourgeons qui fleurissent dans les tubes de culture, sont représentées par le signe +. Celles qui ne présentent pas de gradient, tous les bourgeons néoformés étant végétatifs, sont représentées par le signe — ; enfin les plantes qui ne bourgeonnent pas, sont représentées par le signe 0.

Nicotiana Tabacum

Les bourgeons néoformés sur les fragments prélevés tout au long de la tige des 3 variétés « *Mammoth* » de jour court n'ont pas présenté de gradient d'aptitude à la floraison. Sur les fragments d'entre-nœuds cultivés en jour long comme en jour court tous les bourgeons néoformés sont végétatifs dans nos conditions expérimentales (Pl. IV, 2 et 3).

Les 12 autres variétés expérimentées, indifférentes ou presque indifférentes au

photopériodisme, ont manifesté un gradient comparable à celui de *Nicotiana Tabacum* « W.38 ». La formation sur la hampe de bourgeons composés uniquement d'organes inflorescentiels, est particulièrement évidente chez *Nicotiana Tabacum* « Landes » (Pl. V, 6), « W.38 » (Pl. V, 3) « purpurea », (Pl. V, 4), « lacerata » (Pl. V, 1) « White Burley », « Vuelta Abajo » (Pl. V, 2) et « P₁₁ » (Pl. V, 5). De plus, notons que les boutons néoformés de « White Burley » ont des sépales blanchâtres et que les fleurs de « lacerata » sont dépourvues de sépales.

Nicotiana tomentosiformis

40 fragments de hampe et 40 fragments de tige ont été cultivés *in vitro*. Les fragments prolifèrent, forment un cal mais bourgeonnent mal. 3 bourgeons se sont formés seulement sur les fragments de hampe ; ils sont végétatifs.

Nicotiana suaveolens

Certains des bourgeons néoformés peuvent fleurir précocement en tube. La fréquence de floraison est faible. 3 bourgeons floraux ont été observés sur 50 fragments mis en culture.

Nicotiana sylvestris

Les bourgeons néoformés (Pl. IV, 1) en eupériode, à partir des fragments prélevés sur toute la tige fleurie sont végétatifs ; s'ils sont maintenus plusieurs mois en culture *in vitro*, ils forment des petites rosettes de plusieurs dizaines de feuilles. Aucun cas de floraison n'a été observé sur une centaine de bourgeons disséqués.

Nicotiana glauca × *Langsdorffii*

Les entre-nœuds prélevés sur cet hybride forment des cals. Sur quelques-uns, des axes caulinaires se différencient. Sur les fragments de hampe, il a été observé des branches d'axes caulinaires terminés par une explosion de méristèmes floraux aux sépales bien différenciés, aux pièces florales à l'état de mamelons. Un grand nombre de méristèmes sont ainsi formés (Pl. III, 2) comme cela est observé sur les tumeurs *in vivo*.

Ainsi le gradient de floraison observé chez la variété « W.38 » de *Nicotiana Tabacum* est retrouvé chez les variétés expérimentées (sauf les variétés « Mammoth » qui dans les conditions des essais ainsi rapportés ne fleurissent pas) et se manifeste par la formation de boutons sur chacun des fragments de hampe inflorescentielle cultivés.

La floraison aussi régulière des bourgeons néoformés n'est pas retrouvée chez les *Nicotiana*. Mais il faut remarquer par exemple chez *Nicotiana suaveolens* que le mode de développement buissonnant, et l'inflorescence de la plante, sont différents de ceux de *Nicotiana Tabacum*. Cependant le phénomène de la floraison précoce des bourgeons néoformés existe.

PLANCHE IV. — Bourgeons végétatifs néoformés *in vitro*.

1. — Bourgeon néoformé sur hampe de *Nicotiana sylvestris*.

2 et 3. — Bourgeons néoformés sur hampe et tige de races « Mammoth » 47 et 7.



Chez l'hybride tumoral, la floraison des bourgeons néoformés dépend de leur apparition même qui n'est pas régulière ; chez cet hybride comme chez *Nicotiana Tabacum* « W.38 », la néoformation des boutons se fait aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* sur la hampe florale.

Il est séduisant de rapprocher les résultats négatifs concernant les *Nicotiana Tabacum* « Mammoth » et *Nicotiana sylvestris* qui sont des plantes de photopériodisme absolu. Chez ces plantes les bourgeons néoformés ne fleurissent pas, même dans les conditions eupériodiques. Cette différence de comportement *in vitro* de fragments d'organes d'origine équivalente, pourrait être liée à la différence de comportement physiologique des plantes *in vivo*, justement vis-à-vis des facteurs de la floraison. Chez les Tabacs et *Nicotiana* photopériodiques bourgeonnant sur cal, l'absence de gradient de propension à fleurir manifesté par les bourgeons peut être considérée, soit comme un masquage de l'expression du gradient, soit comme une incapacité génique de fleurir à partir des cals néoformés. Mais il faudra des essais plus variés chez des espèces et races plus nombreuses, avant de pouvoir déduire des conséquences certaines de ces faits initiaux.

TABLEAU III

Floraison des bourgeons néoformés chez quelques espèces de Nicotiana

Nicotiana espèce	Nombre de tubes	Floraison		Région cultivée	Exigence photopériodique
<i>N. Tabacum</i>					
« W.38 »		+	+	H	
« Landes »	3	+	+	H et T	jour long préférante
« Vuelta Abajo »	16	+	+	H	
« P ₁₁ »	16	+	+	H	
« purpurea B »	17	+	+	H	
« lacerata »	11	+	+	H	
« White Burley »	100	+	+	H et T	jour court préférante
« Machu picchu »	15	+		H	
« P ₁₉ »	50	+		H	
« Damas »	20	+		H	
Maryland					
Mammoth »	100	—		H et T	jour court absolue
« Mammoth » race 7	80	—		H et T	jour court absolue
« Mammoth » race 47	80	—		H et T	jour court absolue
« xanthi necroticum »	120	+	+	H et T	
« praecox »	80	+	+	H et T	
<i>N. tomentosiformis</i>	80	0		H et T	jour court
<i>N. suaveolens</i>	50	+		H et T	jour long préférante
<i>N. sylvestris</i>	150	—		H et T	jour long absolue
<i>N. glauca</i> × <i>Langsdorffii</i>	100	+		H et T	

DEUXIÈME PARTIE

ÉTUDE DE L'ORGANOGENÈSE FLORALE A PARTIR DU BOURGEONNEMENT *DE NOVO*

La deuxième partie de notre mémoire concerne l'étude des modalités de l'organogenèse florale de novo à partir de fragments de hampe florale de Tabac « Wisconsin 38 » cultivés aseptiquement. Les plantes utilisées pour ces expériences sont cultivées le plus souvent dans les conditions des Superserres ; elles sont vigoureuses et leur floraison est abondante.

I — MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE D'OBTENTION RÉGULIÈRE DES BOUTONS FLORAUX NÉOFORMÉS

Dans la première partie, les différentes régions de la plante étaient explorées, toutes les conditions de culture étant fixées et déterminées empiriquement. Une région bien déterminée de la plante a été distinguée : la région de l'axe comprise entre la feuille axillant l'inflorescence et la fleur terminale première formée. C'est l'axe de l'inflorescence, que nous avons appelé hampe florale, et dont les fragments sont susceptibles de régénérer des boutons floraux à partir du cal formé en culture aseptique.

Dans la deuxième partie, nous voulons étudier les modalités de l'organogenèse florale, à partir de fragments de hampe cultivés *in vitro*, en faisant varier les facteurs de l'environnement. Avant de commencer cette étude, il fallait contrôler le mode de prélèvement des explantats, la taille des fragments, déterminer le mode d'expression des résultats ; soit, en utilisant le milieu de base et les conditions de culture de la première partie, mettre au point la technique qui permettra par la suite d'étudier l'action des facteurs externes sur l'organogenèse florale à partir des fragments de hampe inflorescentielle de Tabac.

1) Détermination de l'époque de la récolte de la hampe

Consécutivement à la mise à fleur de la plante, la hampe s'allonge tandis que les premiers boutons formés grossissent ; lorsque l'allongement s'achève, la fleur terminale est épanouie. Les fleurs des cymes axillaires s'épanouissent à leur tour. En pleine floraison l'inflorescence est composée de capsules, de fleurs épanouies et de fleurs en bouton. Puis la floraison s'achève, toutes les fleurs de l'inflorescence principale sont en capsules. Lorsque la plante est cultivée dans de bonnes conditions, les rameaux axillaires fleurissent l'un après l'autre en commençant par les plus hauts placés juste en dessous de l'inflorescence principale.

Des hampes ont été prélevées aux différentes périodes de floraison de façon à déterminer la période la plus favorable au prélèvement des fragments à expérimenter. Les résultats sont exposés dans le Tableau IV.

Dès que l'axe a achevé son élongation, la fleur terminale étant fructifiée, et jusqu'à floraison terminée, les fragments prélevés sur la hampe ont la potentialité de former *in vitro* des boutons floraux.

TABLEAU IV

Stades de floraison de la plante en serre, favorables à la néoformation des boutons in vitro à partir des fragments de hampe

Stade de floraison de la plante en serre	Présence de boutons néoformés sur les fragments de hampe
Fleurs en boutons (hampe en cours d'élongation)	— cal
Fleur terminale aux pétales visibles (hampe en cours d'élongation)	— cal
Fleur terminale séchée, 1 ^{re} capsule verte	+
Capsules et fleurs épanouies, pleine floraison	+
Capsules brunes et capsules vertes, plante ramifiée .	+
Capsules brunes, plante ramifiée	+
Capsules brunes, plante non ramifiée	—

Bien qu'il eut été souhaitable de limiter les prélèvements à un stade précis de la floraison, pour des raisons d'ordre pratique, les hampes ont été prélevées dans la suite des expériences après fructification de la fleur terminale, pendant toute la durée de la floraison.

2) Détermination de la dimension optimale des fragments

Dans les expériences précédentes la taille des fragments évaluée approximativement variait entre 6 mm et 10 mm. Nous avons recherché l'influence de la taille du fragment sur la floraison et sur le nombre des bourgeons néoformés.

Plusieurs hampes au même stade de floraison ont été prélevées sur des plantes vigoureuses élevées l'été aux Superserres ; les entre-nœuds ont été stérilisés sans discrimination, puis découpés en fragments de longueur différente allant de 2 mm à 50 mm et comportant tout le diamètre de la tige. Les cultures sont examinées après environ un mois et demi.

1° Lorsque la longueur du fragment est comprise entre 2 mm et 10 mm, sur tous les fragments, des boutons sans feuilles se sont formés sur le cal proximal ; la polarité est donc maintenue. Les boutons sont plus petits sur les fragments de faible épaisseur (fig. 1).

Le nombre de boutons est variable pour une même longueur des fragments. Ainsi dans cette expérience, il est compris entre 6 et 34 pour les fragments de 7 mm de long, entre 7 et 30 pour les fragments de 2,5 mm ; cependant la moyenne du nombre de boutons formés par fragment d'une longueur donnée est voisine de la moyenne générale de l'expérience comportant un nombre suffisamment élevé de fragments (Tableau V).

TABLEAU V

Relation entre la longueur des fragments et la moyenne du nombre de boutons

Longueur des fragments en mm	Nombre de fragments	Nombre moyen de boutons par fragment
2 à 4	12	12,8
5 à 7	15	13,9
8 à 10	14	12,6

Le nombre moyen de boutons ne dépend donc pas de la longueur du fragment dans l'intervalle de taille considéré, mais est caractéristique de l'expérience ; en effet pour une expérience similaire faite avec des plantes d'hiver chétives, le nombre moyen de boutons par fragment est de 3,5.

Les fragments utilisés habituellement forment des boutons sur le cal proximal ; dans le cas particulier où ils sont sectionnés longitudinalement en plusieurs morceaux de faible épaisseur, les boutons se forment aussi sur les surfaces longitudinales des sections, face au cambium (fig. 1).

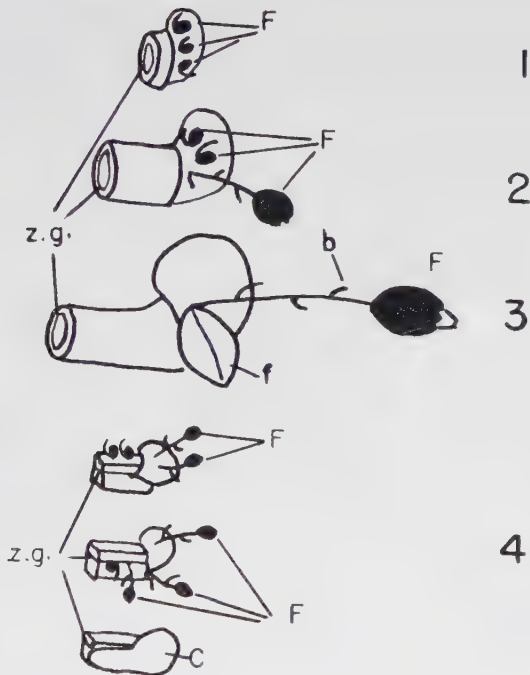


FIG. 1. — Influence de la taille du fragment de hampe florale de Tabac « W. 38 » sur l'aspect des néoformations ; *F* = bouton floral, *b* = bractée, *f* = feuille, *C* = cal, *zg* = zone génératrice. 1 = fragment de 2 mm, 2 = fragment de 8 mm, 3 = fragment de 15 mm, 4 = sections longitudinales minces.

2° Lorsque la taille du fragment excède 10 mm, le nombre de boutons formés diminue rapidement ; pour les fragments de 15 mm les boutons formés sur le cal proximal sont grands, ils sont précédés de feuilles larges (fig. 1), la floraison est donc retardée.

Au-dessus de 20 mm et jusqu'à la longueur totale de l'entre-nœud les fragments ne forment plus d'organes et peu ou pas de cal.

En résumé, il apparaît que dans la limite de longueur optimale des fragments, le nombre de boutons pour une longueur donnée du fragment n'est pas constant ; il varie d'un fragment à l'autre. La moyenne du nombre de boutons par fragment est caractéristique d'une expérience (à condition que le nombre de fragments soit suffisamment élevé) ; elle varie d'une série de plantes à une autre et semble liée aux conditions culturales dont dépend la vigueur de la plante mère.

L'ensemble des observations décrites nous a conduite à préciser la technique utilisée pour l'étude de l'organogenèse florale *de novo*.

3) Exposé de la méthode de culture

MODE DE PRÉLÈVEMENT DES EXPLANTATS

Dans les Superserres où sont cultivées les plantes-mères, les variations de la température et surtout de l'intensité de l'éclairage selon les saisons, introduisent une certaine variabilité dans les résultats.

Pour une même expérience, les plantes sont prélevées au même stade de floraison, compris entre le moment où, la hampe ayant achevé son élongation, la fleur terminale est fructifiée, et la fin de la floraison.

La taille des fragments à ensemercer peut être évaluée à l'œil nu, puisque de 2 mm à 10 mm la moyenne du nombre de boutons par fragment est suffisamment élevée. De façon courante les fragments utilisés mesurent environ 6 mm de long.

Tous les fragments prélevés à partir de plusieurs hampes sont mélangés dans des boîtes de Pétri de telle façon qu'ils soient répartis d'une manière homogène dans les tubes de culture.

Les fragments ne sont pas épluchés, ils sont coupés en deux si le diamètre en est trop important ; il a été constaté que les boutons ne se forment alors que sur le cal.

EXPRESSION DES RÉSULTATS

Nous appellerons Témoin une série de 20 fragments cultivés sur le milieu dit « de base » énoncé dans l'exposé général des techniques avec, selon les expériences une concentration de 30 ou 50 g de glucose par litre.

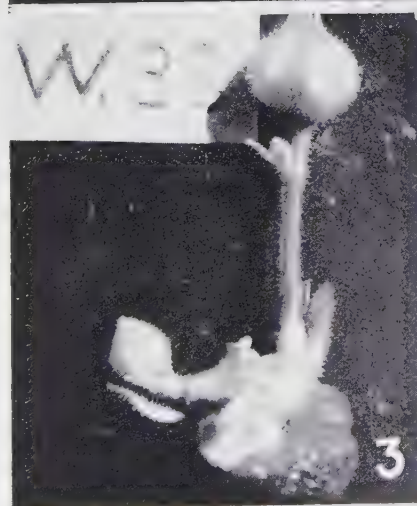
Les tubes sont portés sur des étagères éclairées 16 h par jour par des tubes fluorescents et des lampes à incandescence donnant une intensité moyenne de 5 000 lux.

Les cultures sont examinées 45 jours environ après la mise en expérience, les bourgeons étant examinés à la loupe. L'expérience est considérée comme valable si plusieurs boutons se sont formés sur chaque fragment du témoin.

Le nombre moyen de boutons du témoin variant d'une époque à l'autre de l'année et selon les conditions de culture de la plante, pour chaque expérience un témoin est prévu ; à chaque fois qu'un facteur variera dans le cadre d'une expérience, 20 tubes seront mis en culture.

PLANCHE V. — Boutons néoformés *in vitro* à partir de fragments de hampe de plusieurs variétés de Tabacs.

1. — *Nicotiana Tabacum* « lacerata ».
2. — *Nicotiana Tabacum* « Vuelta Abajo ».
3. — *Nicotiana Tabacum* « Wisconsin 38 ».
4. — *Nicotiana Tabacum* « purpurea ».
5. — *Nicotiana Tabacum* « P₁₁ ».
6. — *Nicotiana Tabacum* « Landes ».



Les principales expériences sont répétées trois fois. Les résultats des trois expériences sont comparés en fonction des témoins de chacune ; ce sont donc les variations par rapport aux témoins qui sont comparées.

Les résultats quantitatifs ne sont pas suffisants pour exprimer les résultats ; lorsque le nombre moyen de boutons par fragment est modifié expérimentalement, simultanément, l'aspect de l'ensemble des néoformations est modifié, ce qui rend illusoire une expression purement quantitative des résultats.

Il en résulte que les résultats sont exprimés en fonction :

- de la nature végétative ou florale des bourgeons néoformés,
- de la morphologie,
- du délai de floraison manifesté par la présence ou l'absence de feuilles,
- du développement des boutons,
- du nombre moyen de boutons par fragment.

II. — ÉTUDE DESCRIPTIVE DE LA NÉOFORMATION DES FLEURS

Nous avons tenté d'aborder l'étude des étapes de l'organogenèse florale, lorsque la fleur se forme *de novo* dans le cal apparaissant au pôle proximal des fragments de hampe inflorescentielle de Tabac.

Les étapes de l'organogenèse florale *in vitro* font intervenir les phénomènes généraux de la néoformation des bourgeons et ceux de l'initiation florale.

Avant de devenir organogènes, les cellules différenciées des organes cultivés *in vitro*, subissent une série de modifications que BUVAT (1944) décrit comme une progressive dédifférenciation cellulaire en deux étapes principales ; au cours de la première, les cellules recouvrent la propriété de se multiplier et le tissu néoformé conduit au plus à l'édification de méristèmes secondaires histogènes ; la seconde phase est caractérisée par l'accentuation de la dédifférenciation de certains groupes de cellules qui se divisent activement et présentent alors les potentialités organogènes des cellules méristématiques primaires.

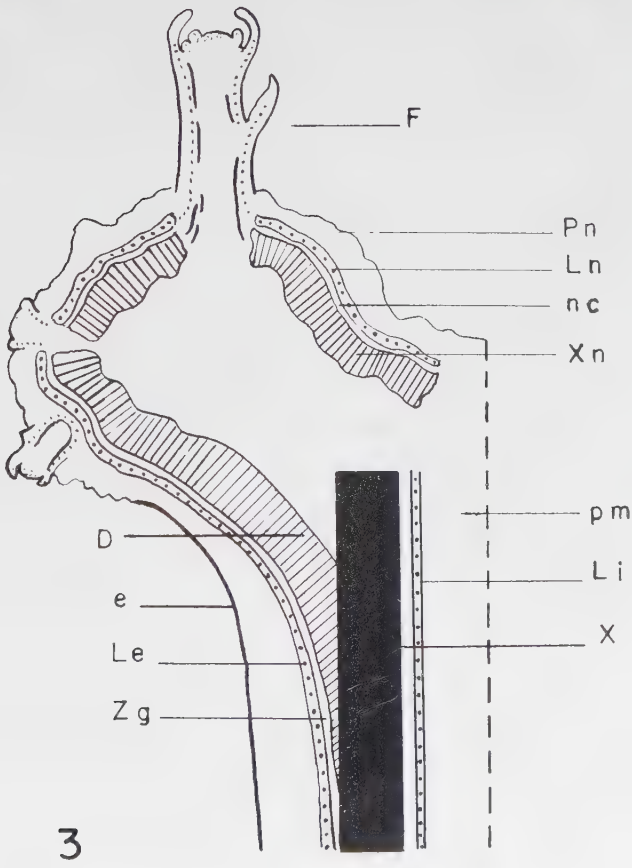
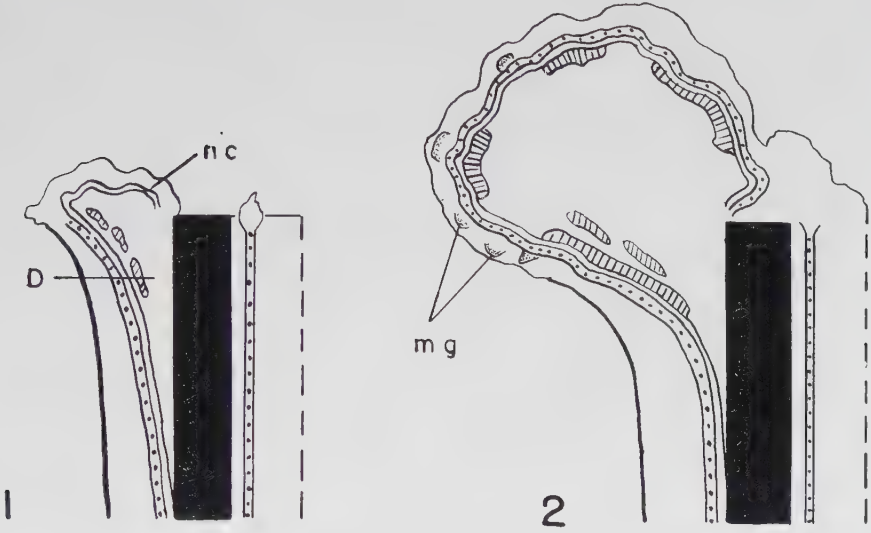
Dans le cas des fragments de hampe, les processus organogènes aboutissent normalement à la formation de boutons floraux.

Des fragments de hampe inflorescentielle de *Nicotiana Tabacum* « W. 38 » sont cultivés dans les conditions témoin qui permettent d'obtenir normalement en fin de culture des fleurs isolées, précédées le plus souvent de 1 ou 3 bractées,

PLANCHE VI. — Structure du cal formé au pôle proximal de fragments de hampe florale de Tabac « W. 38 » cultivés *in vitro*.

Coupes longitudinales schématiques à divers stades de la prolifération sur le milieu de base ; 1. début de la prolifération, les deux cals après environ 8 jours de culture. 2. Réunion des deux cals, apparition des premiers méristèmes gemmaires (14 jours de culture). 3. Cal plus âgé (2 mois de culture) raccords cribro-vasculaires entre le cal et 3 boutons floraux.

D : dynamic wedge ; *e* : épiderme ; *Le* : liber externe ; *Li* : liber interne ; *Ln* : liber néoformé ; *Zg* : zone génératrice libero ligneuse ; *nc* : néocambium ; *X* : xylème ; *Xn* : xylème néoformé ; *pm* : parenchyme médullaire ; *Pn* : parenchyme néoformé ; *mg* : méristèmes gemmaires ; *F* : bouton floral.



l'aisselle des deux dernières bractées peut être vide ou au contraire contenir des boutons. Parfois quelques bourgeons feuillés, alors acaules, peuvent se former.

Les fragments sont prélevés tous les jours au cours de la prolifération consécutive à la mise en culture, et jusqu'à ce que les pièces florales soient organisées. Les coupes histologiques sont orientées parallèlement à l'axe de la hampe de façon à passer par la tige et le cal.

La prolifération affecte la surface de section du pôle proximal du fragment ; dans nos conditions, elle débute environ cinq à six jours après la mise en culture ; une coupe longitudinale faite à ce stade permet d'observer deux zones de prolifération, l'une plus importante au niveau du cambium et du liber externe, l'autre au niveau du liber interne, de sorte que sur les fragments en expérience deux bourrelets concentriques sont observés.

Sur les coupes faites le 8^e jour, les deux zones de prolifération tendent à se réunir. Le cal est composé en surface par un parenchyme banal formé de plusieurs assises de grandes cellules ; la zone sous-jacente formée de cellules plus petites dont le noyau est pariétal, à divisions orientées, présente les caractères d'une zone génératrice (ou cambium néoformé). Cette zone « néocambiale » dont la disposition plus ou moins régulière suit la courbure du cal est en continuité avec la zone génératrice du fragment de la hampe, qui par des divisions tangentielles a provoqué l'élargissement du fragment au pôle proximal, créant ce que les auteurs (STERLING, 1950) appellent un « dynamic-wedge » (Pl. VI, 1).

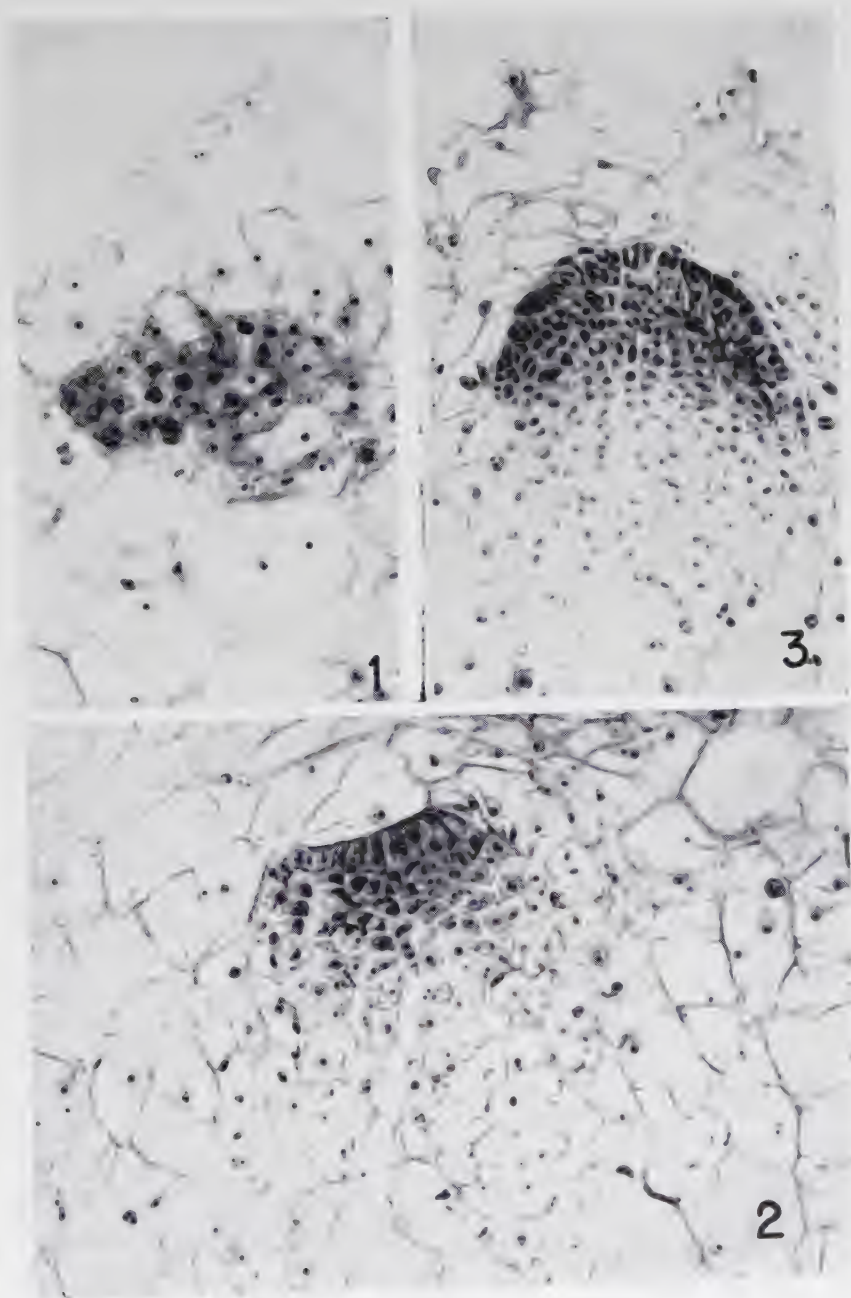
Plus tard, les cellules nées de l'activité néocambiale se différencient en tissus. xylème vers l'intérieur, phloème à l'extérieur. La surface du cal formée par les grandes cellules parenchymateuses signalées ci-dessus ne présente pas dans les cas habituels de différenciation suberophellodermique.

A partir des 8^e et 10^e jours, en certains points du cal situés ordinairement dans le parenchyme superficiel, apparaissent des foyers de prolifération cellulaire composés de quelques cellules qui se recloisonnent (Pl. VII, 1) ; les petites cellules résultant de ces divisions présentent les caractères des cellules des méristèmes primaires : le rapport nucléoplasmique est élevé, le noyau devenu central occupe la plus grande partie du volume cellulaire.

L'activité mitotique se propage aux cellules voisines de manière telle, que très rapidement l'îlot méristématique est affecté d'une polarité : les cellules méristématiques les plus proches de la surface du cal tranchent brutalement sur les grandes cellules parenchymateuses tandis que dans la région sous-jacente il y a passage graduel de cellules méristématiques aux cellules banales du cal (Pl. VII, 2). Finalement les divisions se font de telle sorte que s'individualise une assise frontale plus ou moins nette, parfois paraissant écrasée en certains points, et qui sera l'assise épidermique du méristème. L'îlot méristématique est alors ce qu'il est convenu d'appeler un « méristème gemmaire », en opposition au méristème de « type radiculaire ».

PLANCHE VII. — La néoformation des méristèmes gemmaires dans le cal apparu au pôle proximal des fragments (col. hématoxyline).

1. — Îlot méristématique après 9 jours de culture ($G \times 212$).
2. — Jeune méristème gemmaire après 12 jours de culture ; individualisation d'une assise frontale ($G \times 212$).
3. — Méristème gemmaire après 14 jours de culture ($G \times 162$).



Le degré d'organisation le plus poussé observé chez ces méristèmes est représenté par la photo (Pl. VII, 3). Le méristème a pris la forme d'un dôme apical dans lequel on distingue nettement des assises fortement méristématiques disposées plus ou moins régulièrement, et une zone médullaire. A ce stade, l'agencement des cellules du méristème ne permet pas encore de caractériser un état floral ou végétatif.

Les méristèmes gemmaires n'apparaissent pas simultanément, de sorte que, rares dans les cals observés vers les 8^e-10^e jours, ils sont surtout fréquents à partir du 12^e jour ; chaque cal contient alors plusieurs de ces méristèmes à des stades d'évolution différents. Ils sont situés plus ou moins profondément dans le cal, le plus souvent entre la zone cambiale néoformée et la surface du cal (Pl. VI, 2).

A partir des 14^e jours ou 17^e jours, parfois même dès le 12^e jour, les méristèmes commencent à émerger du cal ; à ce moment ils peuvent avoir déjà formé une ou deux ébauches ou bien en être encore dépourvus. Les premiers organes formés permettent de comparer la structure des méristèmes néoformés aux apex des plantes entières habituellement décrits.

Le cas le plus remarquable où une seule bractée située contre le cal précède le bouton est illustré par la figure (Pl. VIII, 1), qui représente un jeune apex jaillissant hors du cal sur lequel s'observent déjà, au nombre de 5 dans la succession des coupes, les primordiums diversement développés des sépales. De plus, la forme de l'apex large et bombé, sa coloration uniforme, la présence de 5 à 6 assises de cellules régulièrement disposées sous les deux assises tunicales, sont caractéristiques d'un apex floral de Tabac.

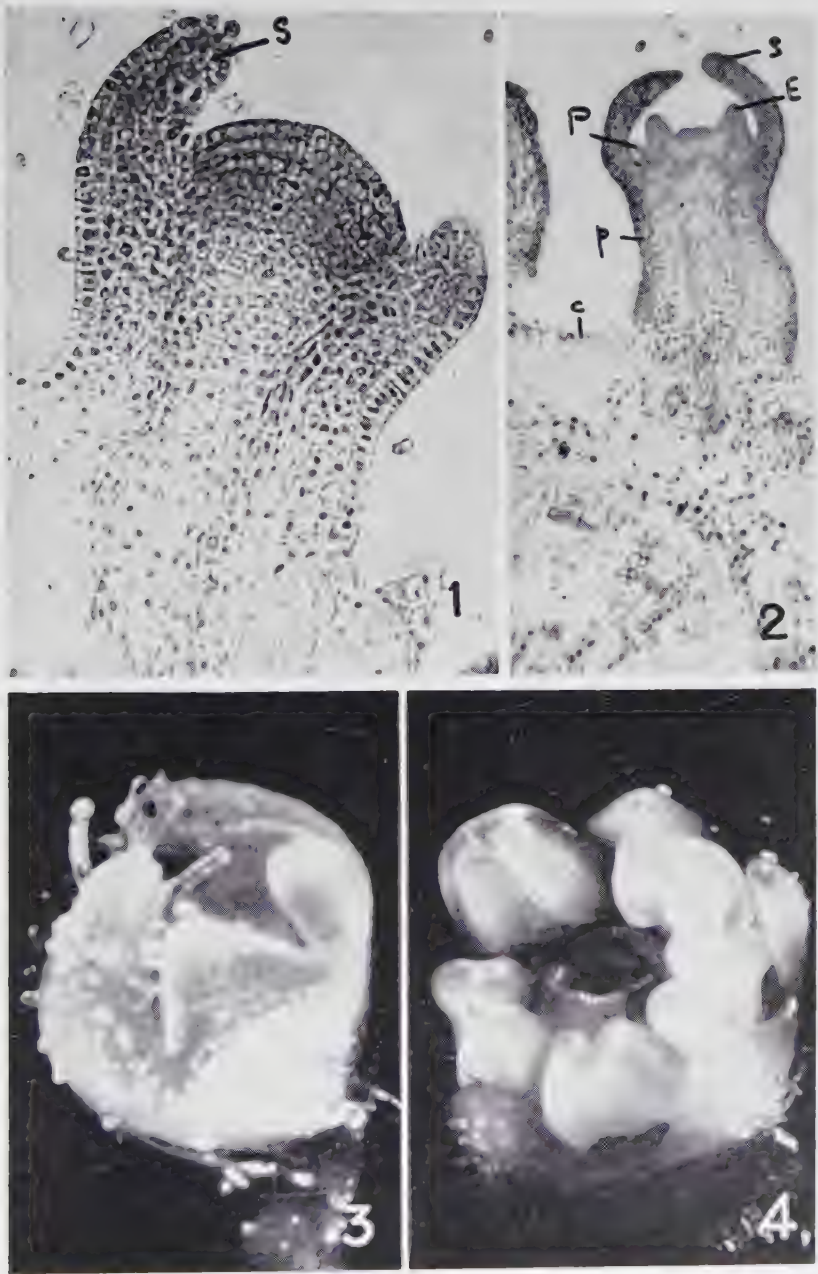
La photo (Pl. VIII, 2) représente la coupe longitudinale d'un jeune bouton néoformé. On remarque l'élongation précoce de l'axe à la formation duquel ne participe aucune feuille ; une seule bractée est observée dans la suite des coupes. Les sépales différenciés les premiers ont un développement rapide ; ils sont bien formés et couverts de poils, tandis que pétales et étamines sont à l'état de mamelons méristématiques et que l'ovaire n'est pas encore formé. Pendant que la jeune fleur se formait le néocambium a fonctionné en donnant du xylème vers l'intérieur du cal et du phloème vers la périphérie ; des raccords cribro-vasculaires peuvent être observés entre les boutons et le cal (Pl. VI, 3).

Après 3 semaines de culture, on observe, sur chaque cal, au minimum un bouton, le plus souvent une dizaine, parfois jusqu'à 30 formant un véritable tapis de boutons ; tous ne sont pas au même stade d'organisation.

En fin d'expérience, après environ 45 jours de culture, sur chaque cal, si parfois un petit nombre de boutons ont seulement les sépales bien différenciés (Pl. VIII, 3), le plus souvent la plupart ont sépales, pétales, étamines et carpelles bien formés (Pl. VIII, 4) ; dans les anthères la méiose est alors effectuée. Tous les boutons

PLANCHE VIII. — Formation des pièces florales.

1. — Jeune apex floral émergeant du cal ($G \times 162$). Coloration vert de méthyle-pyronine. *S* : sépales.
2. — Coupe histologique d'un jeune bouton, ses rapports avec le cal ($G \times 26$). (Coloration hématoxyline). *S* : sépale, *P* : pétale, *E* : étamine, *p* : pédoncule, *c* : cal.
3. — Apex floral néoformé, on voit les 5 sépales.
4. — Jeune bouton néoformé isolé du cal, les sépales sont enlevés on voit les pétales, les étamines et l'ovaire.



restent petits : seul l'un d'entre eux domine, son pédoncule s'allonge, le bouton grossit pour atteindre finalement la taille normale d'un bouton de Tabac (Pl. IX, 1). Il arrive que ce bouton dominant s'épanouisse (Pl. IX, 2) ; s'il n'y a pas fécondation, la fleur se fane, et très tôt apparaît une aire d'abscission. Une autre fleur peut alors grandir et s'épanouir (AGHION, 1962). S'il y a fécondation une capsule se développe (Pl. IX, 3). La plante est autogame, mais pour qu'une assez grande quantité de pollen arrive au stigmate, une intervention aseptique est nécessaire.

Les graines arrivent à maturation dans le tube de culture. Semées, elles présentent un pourcentage de germination élevé, les plantes obtenues sont normales et ont pu être utilisées pour d'autres essais.

Il est à remarquer que la taille des fleurs néoformées est identique à celle des fleurs qui se forment sur la plante en serre : alors qu'il est d'observation courante que les organes néoformés *in vitro* demeurent petits.

Au cours du déroulement des processus qui viennent d'être décrits, 3 phases essentielles peuvent être dégagées (AGHION-PRAT, 1965).

Au cours d'une première phase que nous appellerons *phase histogène*, la prolifération cellulaire aboutit à la formation d'un cal composé de cellules parenchymateuses dans lequel les cellules les plus différenciées sont celles d'une assise néocambiale. Cette assise néocambiale poursuivra par la suite son activité histogène tandis que la différenciation cellulaire se poursuit jusqu'au stade méristématique primaire dans certains groupes de cellules situés dans la région périphérique du cal. Cette phase aboutit, dans le cas des fragments de hampe, à la néoformation de boutons floraux, nous l'appelons *la phase d'organogenèse florale* : elle est elle-même constituée de deux phases :

La phase d'organogenèse gemmaire pendant laquelle la différenciation de certains groupes de cellules aboutit à la formation d'îlots méristématiques qui s'organisent, se structurent en jeunes méristèmes gemmaires possédant un axe et une symétrie, et encore non orientés dans la voie florale ou végétative.

La phase du virage anthovégétatif dont l'analyse nécessite une étude cytologique qui n'a pu entrer dans le cadre de cette recherche. Nous n'avons pu saisir que l'expression accomplie du *virage floral* lors de l'initiation des premiers organes floraux et suivre cette « mise à fleur *de novo* » jusqu'à la tétrasporogénèse.

Cette brève étude histologique qui nous a permis de morceler en phases le déroulement des processus conduisant à la néoformation de fleurs, apporte des repères et aide à l'interprétation de l'étude physiologique qui sera exposée dans les chapitres suivants.

III. — ÉTUDE DES FACTEURS DE L'ENVIRONNEMENT DANS LEURS RAPPORTS AVEC L'ORGANOGENÈSE FLORALE *DE NOVO*

A. Conditions minimales nécessaires à la néoformation de boutons floraux *in vitro* à partir des fragments de hampe de tabac

Le matériel végétal étant défini ainsi que le phénomène à analyser, nous avons recherché quels sont les éléments du milieu qui sont nécessaires à la néoformation de boutons floraux à partir des fragments de hampe florale de Tabac.

Le milieu de culture « témoin » a été choisi empiriquement au début de l'expérimentation, rappelons qu'il est composé de la solution minérale de KNOP diluée au demi, des oligoéléments de BERTHELOT, des vitamines B₁, acide nicotinique et pyridoxine et de glucose. Ce milieu est assez riche en sucre (30 g/l ou 50 g/l de glucose) et il est dépourvu de substances de croissance. La température et l'éclairement sont contrôlés.

Plusieurs séries de cultures de fragments de hampe, comportant 20 tubes chacune, sont faites dans des conditions modifiées par l'absence d'un ou de plusieurs des facteurs habituels de l'environnement. Toutes les cultures sont faites à la même température ; l'action de ce facteur n'a pas été étudiée.

Les résultats de cette expérimentation figurent dans le Tableau VI.

TABLEAU VI

Nombre moyen de boutons par fragment en fonction de la composition du milieu de culture (Chaque facteur est représenté par une croix, son absence du milieu est symbolisée par un trait)

Lumière	Knop	Oligoéléments	Vitamines	Glucose 50 g/l	Nombre de boutons par fragment
					13,5
					14,4
					12,6
					14
					0,5
					10,8
					1,5
					0 pas de prolifération

Lorsque le milieu de culture ne contient pas les vitamines ou la solution minérale de KNOP ou les oligoéléments de BERTHELOT, le nombre moyen de boutons formés par fragment est analogue au témoin.

Lorsque le milieu est dépourvu simultanément des trois facteurs précédents : vitamines, oligoéléments et solution de KNOP, le nombre de boutons formés par rapport au témoin, bien que légèrement inférieur pour cette expérience, demeure élevé et du même ordre de grandeur.

Les deux facteurs de l'environnement, lumière et glucose, sont donc suffisants pour que s'effectue l'organogenèse florale à partir des fragments de hampe inflorescentielle de *Nicotiana Tabacum* « W. 38 ».

De plus, sur les fragments cultivés à l'obscurité ou sur un milieu sans sucre, on note une nette inhibition de la formation des boutons. Lorsque ces deux conditions sont réunies les fragments ne prolifèrent pas du tout.

Il apparaît donc d'après ces premiers résultats que la lumière d'une part, le glucose d'autre part, sont les seuls facteurs nécessaires à la néoformation des boutons à partir des fragments de hampe de Tabac « W. 38 ».

Nous allons étudier plus en détail, l'action de chacun de ces deux facteurs sur l'organogenèse florale *de novo*, c'est-à-dire sur la néoformation des méristèmes et sur leur floraison.

B. Action des glucides

B₁) Effet de différents glucides sur l'organogenèse florale

Le fait que le glucose soit nécessaire à la néoformation des boutons floraux sur les fragments de hampe peut s'expliquer, soit par une action osmotique, soit par une action spécifique propre, soit par l'exigence de métabolites énergétiques. Une série d'expériences a été faite en remplaçant le glucose ordinairement utilisé comme source de carbone par d'autres glucides et par le mannitol ; les cultures sont éclairées.

Quatre glucides généralement métabolisés en culture *in vitro* ont été utilisés, ce sont : le saccharose, le glucose, le lévulose, le maltose.

Le mannitol qui est indifférent dans les cultures de tissu de Tabac (HILDEBRAND et RIKER, 1949) a été employé à une concentration suffisante pour produire une pression osmotique équivalente à celle du glucose efficace sur la néoformation des boutons.

Les résultats sont exposés dans le tableau suivant (tableau VII). Dans cette expérience le nombre moyen de boutons par fragment n'a pas été compté ; les croix du tableau indiquent que les fragments de hampe ont proliféré et fleuri, c'est-à-dire formé de un à plusieurs boutons floraux par fragment.

TABLEAU VII
Néoformation de boutons en fonction des hydrates de carbone présents dans le milieu de culture

Substance	Concentration g/l		Néoformation de boutons
Glucose	30	50	+
Saccharose	50	100	+
Maltose	50	100	+
Fructose	30	50	+
Mannitol	30		—

Les quatre glucides assimilables utilisés ici, ont provoqué la formation de boutons floraux ; au contraire, en présence de mannitol, les fragments de hampe n'ont pas fleuri, les cultures ont alors un aspect analogue à celles faites sur le milieu dépourvu de sucre : prolifération d'un cal et formation sporadique de quelques bourgeons.

Cette expérience indique que les glucides assimilables sont nécessaires à la néoformation des boutons.

PLANCHE IX. — Le développement de la fleur.

1. — Boutons.
2. — Fleur épanouie néoformée.
3. — Capsule.



B₂) Effet de différentes concentrations de glucides sur la néoformation des boutons floraux à partir des fragments de hampe

Des fragments de hampe inflorescentielle de *Nicotiana Tabacum* « W. 38 » sont ensemencés sur des milieux type de base qui diffèrent seulement par la concentration de sucre. Les cultures sont exposées à la lumière. Les quantités de glucose ou de saccharose employées sont : 0 ; 3 ; 7,5 ; 15 ; 30 ; 50 ; 75 ; 100 ; 125 ; 150 ; 175 g/l.

L'observation macroscopique rapide en fin de culture révèle une différence notable dans l'apparence des cultures faites sur ces différentes quantités de sucre : les fragments cultivés sur des concentrations suffisamment élevées de glucose ou de saccharose réagissent en formant des boutons tandis que les fragments cultivés sur les concentrations plus faibles de sucre forment de grands bourgeons aux feuilles larges et vertes. Un examen plus attentif et la dissection à la loupe montrent que ces feuilles peuvent cacher des boutons plus ou moins développés.

Avec les différentes concentrations de sucre, on a, tout à la fois, variation du nombre des fleurs formées, variation de l'aptitude à fleurir, la floraison des bourgeons néoformés étant plus ou moins précoce, variation du développement du bouton depuis l'ébauche méristématique jusqu'à la fleur épanouie, variation de la morphologie de la feuille.

Pour la clarté de l'exposé chacune de ces caractéristiques sera examinée séparément.

1. NOMBRE DE FLEURS FORMÉES

Pour exprimer les résultats on ne tiendra compte que de la floraison des méristèmes en tube de culture, que celle-ci soit survenue précocement ou que les bour-

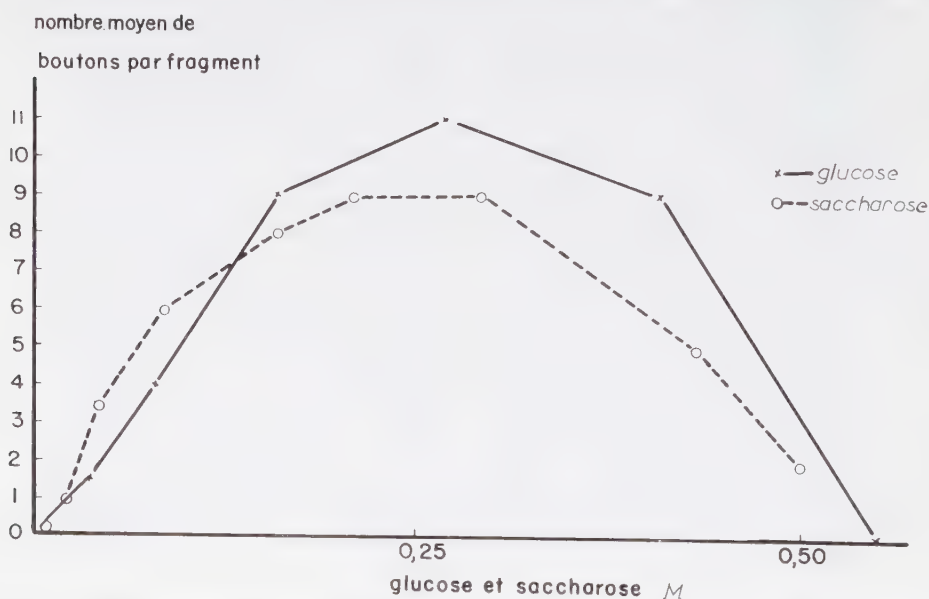


FIG. 2. — Action du glucose et du saccharose sur le nombre de boutons néoformés à partir des fragments de hampe florale de Tabac « W. 38 ».

geons aient d'abord formé des feuilles, que le bouton se soit développé en fleur ou que les organes floraux soient restés à l'état de mamelons.

Il y a accroissement du nombre de fleurs avec la quantité de sucre que contient le milieu jusqu'à un optimum, puis décroissance ; le glucose est plus rapidement toxique que le saccharose pour les mêmes concentrations pondérales utilisées. Les résultats de six expériences sont représentés sur la figure 2. La courbe de glucose groupe des résultats de deux expériences, soit environ 40 tubes ; la courbe du saccharose groupe 4 expériences, soit environ 80 tubes pour chaque concentration.

Les résultats sont exprimés en fonction de la concentration molaire des deux glucides et permettent de constater que le nombre de boutons formés en présence de glucose ou de saccharose est équivalent pour une même concentration molaire de ces composés avec optimum du nombre de fleurs formées autour de la concentration 0,25 M (50 g/l de glucose, 75 et 100 g/l de saccharose) et inhibition lorsque la concentration molaire est supérieure à 0,5 M.

2. DÉVELOPPEMENT DES FLEURS

L'expérience décrite a été faite avec diverses doses de glucose.

Lorsque le milieu est dépourvu de glucose, un léger cal vert se forme, parfois un bourgeon, très rarement un méristème de fleur. Pour les très faibles concentrations de glucose, les boutons sont rares et très petits, les pièces florales sont à l'état de mamelons méristématiques sur le cal, ou terminent l'axe des bourgeons aux feuilles arrondies. Ces méristèmes floraux n'évoluent pas plus si la culture est maintenue en expérience.

Lorsque le milieu contient 15 g/l de glucose, les boutons sont plus nombreux, ils sont plus gros, visibles à l'œil nu, les pièces florales entièrement différenciées.

En présence de 30 et 50 g de glucose, le maximum du nombre de boutons est atteint, l'un d'eux domine, grossit, peut fleurir (Pl. X, 3). Il est à noter que la taille des fleurs est normale.

Lorsque la concentration de glucose atteint 75 g/l, les boutons moins nombreux sont moins développés, les sépales et le cal sont jaunâtres.

A partir de 100 g/l de glucose il n'y a plus d'organes sur le cal.

3. DÉVELOPPEMENT DES FEUILLES

Pour les faibles concentrations de glucose, on observe des bourgeons aux feuilles arrondies et petites, disposées en rosette (Pl. X, 1 et 4). Cet aspect, n'est pas sans rappeler celui des jeunes plantes de Tabac. Les concentrations de sucre croissant, la taille des feuilles s'accroît avec un maximum pour 15 g/l de glucose (Pl. X, 2), l'axe des tiges peut s'allonger.

Le nombre de bourgeons végétatifs formés selon la concentration croissante de sucre n'a pas été compté, comme l'a été le nombre de boutons. D'après nos observations on peut dire, que déjà nombreux pour 3 g/l de glucose, le nombre de bourgeons végétatifs formés atteint un maximum vers 7,5 g/l à 15 g/l puis décroît jusqu'à 30 g/l, selon une courbe dont l'optimum serait décalé par rapport à la courbe des boutons, vers les faibles concentrations de sucre.

Pour la concentration de 30 g/l de glucose, quelques feuilles larges sont encore observées. Mais la plupart des néoformations sont constituées par des organes floraux.

Pour la concentration de 50 g/l de glucose, les bractées sont réduites en nombre et en taille (Pl. X, 3). Pour les concentrations plus élevées, le nombre d'écailles foliaires précédant le bouton augmente, elles entourent le bouton, elles sont jaunes, épaisses et donnent aux néoformations l'aspect caractéristique des petits systèmes « Tige-feuille-Fleur » qui sont observés habituellement sur les fragments de tige de Tabac.

4. APTITUDE A LA FLORAISON DES MÉRISTÈMES NÉOFORMÉS

Pour les concentrations optimales de glucose, l'observation macroscopique et histologique montre que les nombreux méristèmes gemmaires néoformés, s'organisent en inflorescence ou en fleur, manifestant ainsi leur aptitude très précoce à fleurir.

Il n'en est pas ainsi, lorsque les fragments de hampe sont cultivés sur une concentration plus faible de glucose ; des feuilles se forment, manifestant une phase végétative. L'étude histologique de l'apex des bourgeons néoformés a été faite en fin de culture, alors que l'évolution définitive des méristèmes est considérée comme étant atteinte.

Cette étude a permis de constater (AGHION, 1964) que l'évolution des méristèmes peut alors s'effectuer de trois manières :

- l'apex demeure végétatif,
- l'apex devient inflorescentiel,
- l'apex après avoir formé quelques feuilles est floral.

L'ensemble de ces observations montre que dès les plus faibles quantités de sucre utilisées, des méristèmes gemmaires sont néoformés à partir des fragments de hampe.

La faible concentration en sucre du milieu retarde la floraison des méristèmes néoformés, ceux-ci passant alors par une phase végétative plus ou moins longue, et empêche même fréquemment l'expression de la floraison avec arrêt du développement au stade végétatif ou inflorescentiel.

B₃) Effet de différentes concentrations de glucose sur l'expression du gradient axial de floraison

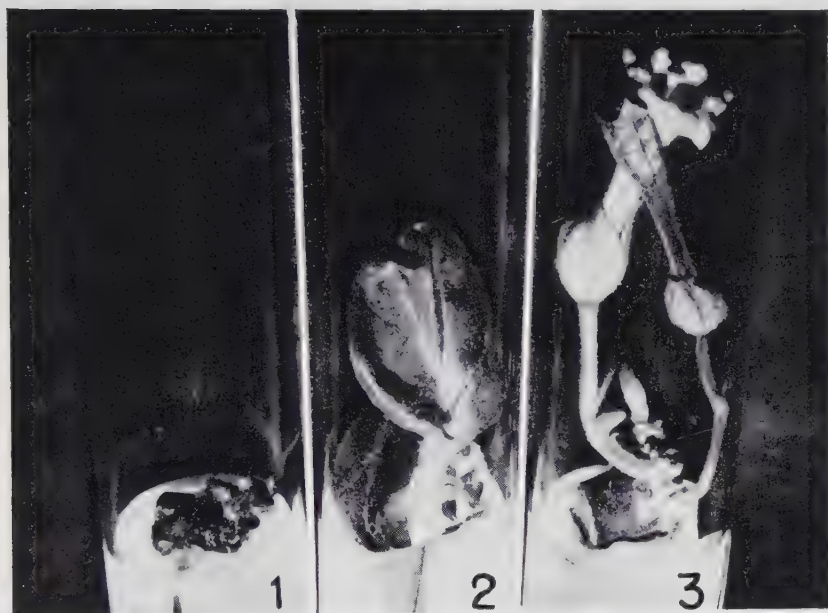
L'action de concentrations croissantes de glucose sur l'aptitude à la floraison des bourgeons néoformés à partir des fragments prélevés sur toute la région de la tige de Tabac W. 38 a été recherchée.

Des fragments sont prélevés sur des entre-nœuds situés à plusieurs niveaux de la tige des Tabacs. Les fragments provenant des différents entre-nœuds sont repérés et cultivés sur des milieux contenant des doses croissantes de sucre : 3 g, 10 g, 30 g, 50 g, 75 g de glucose par litre de milieu.

Les 3 régions hampe, sous-hampe et tige sont prélevées séparément sur les plantes fleuries, les entre-nœuds sont numérotés à partir de la fleur terminale ; 20 fragments provenant de chacune des 3 régions sont ensemencés sur les 5 concentrations de glucose.

PLANCHE X. — Action des diverses concentrations de glucose sur l'aspect des néoformations à partir de fragments de hampe de *Nicotiana Tabacum* « W. 38 ».

1. — Bourgeons néoformés sur milieu dépourvu de sucre.
2. — Bourgeons néoformés sur milieu 15 g/l de sucre.
3. — Fleurs néoformées sur 50 g/l de glucose.
4. — Bourgeons néoformés sur 3 g/l de glucose.



Les entre-nœuds subterminaux de plantes non fleuries ont été prélevés à partir de deux lots : un lot de plantes adultes, un lot de plantes jeunes. 20 fragments de tige provenant de chaque lot de plantes sont cultivés sur chacune des concentrations de glucose.

RÉSULTATS CONCERNANT LES PLANTES FLEURIES

Les résultats relatifs au nombre moyen de boutons ou de systèmes « Tige-feuille-Fleur » formés par fragment provenant des trois régions de la tige en fonction de la concentration en sucre du milieu, sont indiqués dans le tableau VIII.

TABLEAU VIII

Moyenne du nombre de boutons et bourgeons floraux par fragment en fonction de la concentration du milieu en glucose. Prélèvements faits sur hampe et tige de plantes fleuries

Concentration glucose	Hampe entre-nœud 1 à 6	Sous-hampe entre- nœud 7 et 8	Tige entre-nœud 9 à 16
3 g/l	0	0	0
10 g/l	4	3	0
30 g/l	9	5	0,2 TFF
50 g/l	11	7	1 TFF
75 g/l	9	3	2 TFF

— milieu 3 g/l de glucose : les fragments provenant des trois régions de l'axe ont tous formés un léger cal et des petits bourgeons aux feuilles arrondies ; aucune différence entre les trois régions n'est décelable à l'observation.

— milieu 10 g/l de glucose : des bourgeons aux grandes feuilles se forment aussi bien sur les fragments de hampe, de sous-hampe et de tige, mais des boutons sont visibles sur les fragments de hampe, ce qui crée une différence.

— milieu 30 g/l de glucose : sur les hampes se forment uniquement des boutons, tandis que les bourgeons se forment sur la tige.

— milieu 50 g/l de glucose : boutons sur la hampe, peu de bourgeons sur la tige mais augmentation du nombre des systèmes « Tige-feuille-Fleur » sur cette dernière région.

— milieu 75 g/l de glucose : tous les bourgeons qui se développent sont floraux aussi bien sur les fragments de hampe que sur ceux de tige. Le nombre de bourgeons floraux s'accroît de la base au sommet de la tige.

Aux faibles concentrations de sucre, le gradient de propension à fleurir des bourgeons néoformés est inexistant ou peu net, des bourgeons végétatifs se développent sur toutes les régions de la tige ; avec l'augmentation de la concentration du sucre, le gradient est révélé tel que nous l'avons décrit, puis pour des concentrations plus fortes son expression est modifiée, tous les bourgeons qui se forment sont floraux, mais un gradient axial de floraison subsiste car le nombre de bourgeons floraux formés augmente des régions proximales aux régions distales prélevées.

RÉSULTATS CONCERNANT LES ENTRE-NŒUDS SUBTERMINAUX DE PLANTES NON FLEURIES

Sur les concentrations de glucose allant de 3 g/l à 30 g/l les fragments provenant des deux lots de plantes réagissent de la même façon : les fragments de tige forment des bourgeons.

Sur le milieu contenant 50 g/l de glucose le nombre de bourgeons est réduit, deux bourgeons floraux de type caractéristique des « Tige-feuille-Fleur » sont comptés sur les 20 fragments provenant de plantes jeunes, soit 0,1 en moyenne par fragment.

Dès la concentration de 75 g/l les fragments provenant des plantes jeunes et ceux provenant des plantes âgées réagissent différemment : les fragments provenant de plantes jeunes ne réagissent plus, ils ne prolifèrent pas ; tandis que ceux provenant des plantes plus âgées forment un cal et une moyenne de 0,3 système « Tige-feuille-Fleur » par fragment. Ils forment seulement un cal indifférencié sur le milieu contenant 100 g/l de glucose.

On note donc, sur les fragments prélevés sur les entre-nœuds subterminaux de plantes végétatives, une légère augmentation du nombre de bourgeons floraux formés avec l'augmentation de la concentration du glucose, et un comportement différent vis-à-vis des concentrations élevées de glucose, selon que les fragments proviennent des régions subterminales des tiges de plantes jeunes ou plus âgées.

B4) Effet de différentes concentrations de glucose dans deux cas particuliers où le gradient de floraison n'est pas observé

1. CAS DES FRAGMENTS PRÉLEVÉS SUR DES HAMPES INFLORESCENTIELLES DE « W. 38 » EN COURS D'ÉLONGATION

Les fragments sont cultivés sur milieu contenant 7,5, 15, 30, 50, 75, 100 g/l de glucose. Quelle qu'ait été la concentration de sucre utilisée les fragments prélevés sur des hampes de « W. 38 » en cours d'élongation ont formé un cal et sporadiquement quelques boutons, la moyenne du nombre de boutons par fragment demeure inférieure à 1, même pour la concentration optimale de 50 g/l de glucose.

2. CAS OÙ LES BOURGEONS NÉOFORMÉS SUR LES ENTRE-NŒUDS DE PLANTES FLEURIES NE PRÉSENTENT PAS DE GRADIENT DE FLORAISON ; fragments d'entre-nœuds de *Nicotiana Tabacum* « Maryland Mammoth » et de *Nicotiana sylvestris*.

Des fragments prélevés de bas en haut, sur tout l'axe des plantes fleuries, sont cultivés sur des milieux contenant 15, 30 et 60 g de glucose. Les cultures sont exposées à des éclairages de jour court et de jour long.

Ces modifications de la quantité de sucre n'ont pas fait apparaître de gradient. Dans toutes les conditions, les cultures de *Nicotiana sylvestris* et de *Nicotiana Tabacum* « Maryland Mammoth » ont formé un cal, et, sur celui-ci, des bourgeons végétatifs.

Dans ces deux cas la nutrition carbonée n'est pas le facteur limitant de la floraison, la non-floraison serait plutôt due à un facteur inhérent aux fragments de hampe utilisée : dans un cas l'état physiologique de la hampe au moment du prélèvement, dans l'autre la variété ou espèce utilisée.

L'action des glucides sur l'organogenèse florale *de novo* chez *Nicotiana Tabacum* « W. 38 » peut se résumer comme suit :

Sur le milieu dépourvu de sucre, les fragments de hampe de *Nicotiana Tabacum* « W. 38 » lorsqu'ils sont exposés à la lumière prolifèrent, forment un cal et parfois quelques bourgeons.

L'action de concentrations croissantes de glucides assimilables se résume ainsi : de faibles doses de sucre suffisent à la néoformation des méristèmes gemmaires ; l'aptitude à fleurir des méristèmes, faible ou nulle pour ces doses peu élevées, augmente avec la quantité de sucre apportée dans le milieu, jusqu'à un optimum pour lequel les méristèmes plus nombreux s'organisent directement en inflorescence ou en fleur.

Le gradient de floraison, exprimé par l'aptitude à fleurir des fragments prélevés le long de l'axe de la plante n'apparaît en conséquence que sur des concentrations suffisantes de sucre. De plus, les concentrations élevées de sucre favorisent la floraison des bourgeons néoformés sur la tige, à des concentrations qui inhibent le bourgeonnement végétatif.

C. Action de la lumière

Deux facteurs de l'environnement sont nécessaires à la néoformation d'un nombre optimal de boutons à partir des fragments de hampe : les glucides et la lumière. Sur le milieu complet, les fragments de hampe exposés à la lumière peuvent former un nombre relativement élevé de boutons. A l'obscurité toutes autres conditions égales, le nombre de boutons formés est bien inférieur.

La néoformation des boutons sur milieu complet sera étudiée d'abord en fonction de l'éclairage (énergie émise, durée de l'éclairement, spectre d'émission) puis l'organogenèse florale à la lumière sera comparée aux résultats obtenus en cultivant les plantes à l'obscurité.

C₁) Action de la lumière sur l'organogenèse florale

Il n'a pas été fait d'expériences spéciales concernant l'énergie lumineuse, mais au cours de l'ensemble de nos expériences en lumière blanche nous avons obtenu des moyennes d'environ 10 boutons par fragment sous des cadres lumineux donnant de 1 000 lux à 6 000 lux, soit 4 500 à 27 000 ergs/cm²/s.

Les cultures ont été placées en conditions de jour long et en conditions de jour court, c'est-à-dire qu'elles ont reçu par jour, 16 h ou 9 h d'un éclairement donnant 3 600 lux, soit 16 000 ergs/cm²/s.

Dans ces conditions, pour une même expérience, nous avons obtenu les moyennes suivantes :

- 14 boutons par fragment en jour long,
- 9 boutons par fragment en jour court.

Ces deux valeurs sont élevées et montrent que ni la néoformation des méristèmes, ni leur floraison ne sont sous le contrôle absolu du photopériodisme, mais semblent plutôt en rapport avec l'énergie reçue, ce qui est également confirmé par l'expérience suivante faite en éclairement intermittent :

Les tubes sont placés dans un appareil réduisant l'énergie reçue à 1/15 par un système donnant 40 s d'éclairement à 16 000 ergs/cm²/s toutes les 10 mn. Dans ces conditions le nombre de boutons formés par fragment est de 0,5, tandis que le témoin éclairé 16 h par jour par le même plafond lumineux a formé un nombre moyen de 15 boutons par fragment.

Il ressort d'expériences préliminaires faites en lumières colorées que dans toutes les conditions des boutons se sont formés ; seules les cultures exposées au bleu et au rouge ont formé un nombre moyen élevé de boutons par fragment.

C₂) Organogenèse florale à l'obscurité

Les fragments de hampe cultivés à l'obscurité forment des cals blanc jaunâtre qui sont pour la plupart dépourvus d'organes. Cependant sur quelques cals un bouton est observé ; les organes floraux sont alors bien développés, et l'aspect du bouton est semblable à l'aspect des boutons formés à la lumière, sinon qu'il est blanc au lieu d'être vert.

Plusieurs expériences réparties sur plusieurs années et résumées dans le tableau IX ont été faites (avec 30 g/l de glucose).

TABLEAU IX
Nombre moyen de boutons formés à l'obscurité sur les fragments de hampe

Nombre de tubes	Moyennes (boutons par fragment)	
	lumière	obscurité
20	14	0,05
10	3	0,1
10	13	2
10	10	1
20	3,7	0,2
20	10	0,4
10	5	0,5

Pour chaque expérience, le nombre de boutons formés à l'obscurité est toujours inférieur au nombre de boutons formés à la lumière ; la moyenne des boutons observés par fragment pour l'ensemble des expériences (100 tubes) est alors 6,0 à la lumière, et 0,4 à l'obscurité.

A titre de comparaison, des fragments de tige ont été cultivés à l'obscurité sur milieu contenant aussi 30 g/l de glucose.

Au total 70 tubes ont été ensemencés avec des tiges, le nombre de bourgeons formés à l'obscurité est très faible, souvent nul : moyenne 0,05 bourgeon par fragment. A la lumière, le nombre de bourgeons formés dépend de la région prélevée et ne dépasse pas une moyenne de 3 bourgeons par fragment.

En résumé, à l'obscurité il y a réduction du nombre de bourgeons formés sur les fragments de tige et sur les fragments de hampe. Sur les fragments de hampe, lorsque des bourgeons se forment, ils fleurissent, et les organes floraux sont normalement organisés.

La réduction du nombre de boutons formés à l'obscurité pouvait résulter soit du non-développement d'ébauches méristématiques qui se seraient formées, soit de la non-formation des ébauches. Nous avons constaté que les cals ne portant pas d'organes visibles à l'œil nu, ne renfermaient pas non plus de méristèmes gemmaires décelables à l'examen histologique (Pl. XI, 1).

A l'obscurité, dans la majorité des cals, la dédifférenciation s'arrête à la phase

histogène ; il n'y a pas de phase organogène. Mais lorsqu'un méristème gemmaire se forme, la floraison, la différenciation des organes de la fleur peuvent s'effectuer.

C₃) Action de la lumière au cours du déroulement de l'organogenèse florale

Les tubes de culture contenant les fragments de hampe sont d'abord exposés à la lumière, puis sont transférés à l'obscurité par lots de 20, tous les deux jours, pendant les trois premières semaines suivant l'ensemencement.

Les résultats de deux expériences, l'une examinée après 41 jours de culture, l'autre après 74 jours, sont exposés dans le tableau X. On remarque que les résultats diffèrent de l'une à l'autre :

TABLEAU X
Néoformation des boutons par des fragments de hampe cultivés d'abord à la lumière, puis transférés à l'obscurité

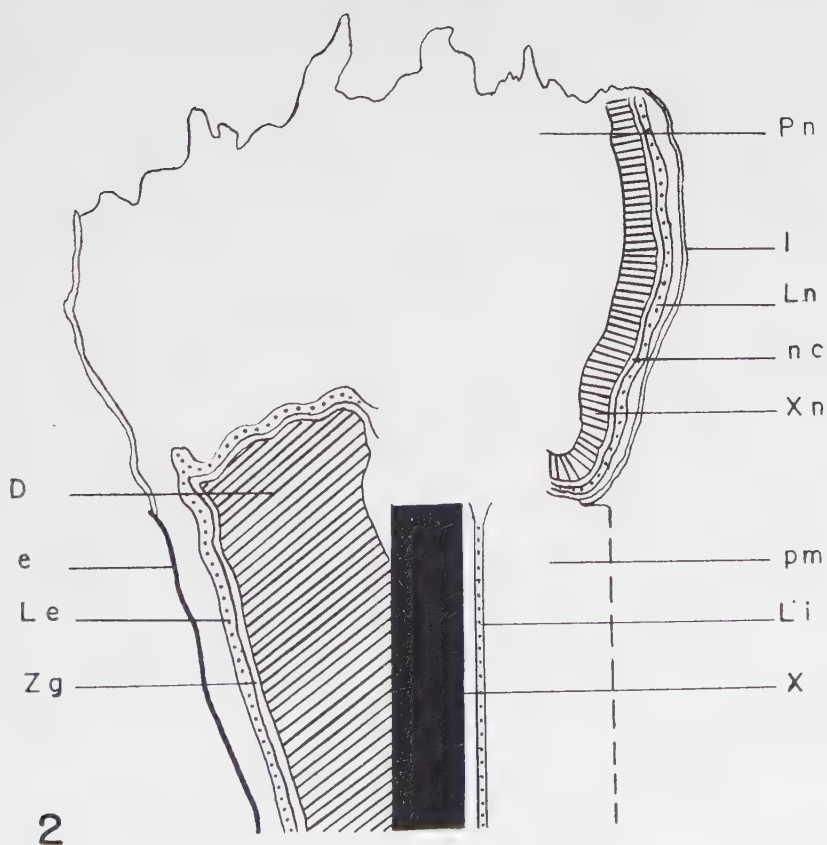
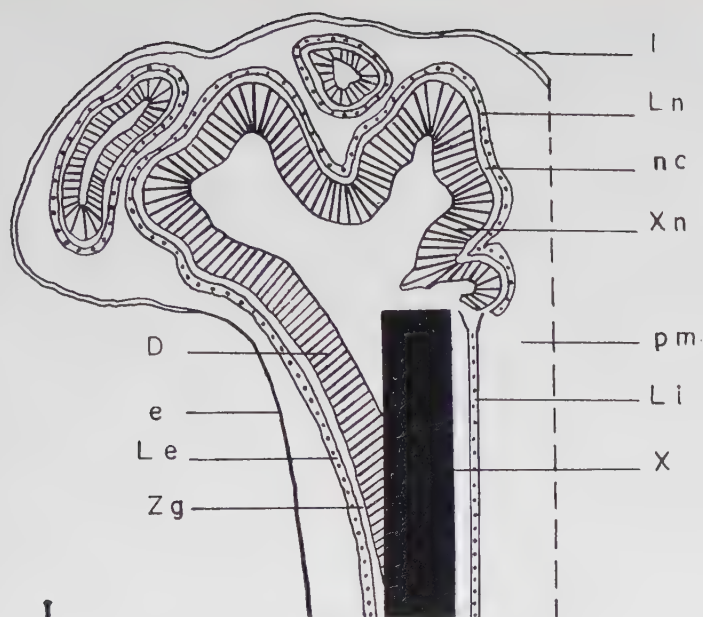
Nombre de jours de culture à la lumière précédant le transfert à l'obscurité	1 ^{re} expérience	2 ^e expérience
	Nombre moyen de boutons par fragment après 41 jours de culture	Nombre moyen de boutons par fragment après 74 jours de culture
0	0,5	1
2	0,9	0,5
5	1,2	0,7
7	1	1,1
9		0,8
11		10
12	1	
14	1,3	10
16	1	
19	1	10
20	1,3	
22	9	10
25	10	
27	10	

Pour la première expérience, les tubes laissés 12 jours ou moins à la lumière puis transférés à l'obscurité n'ont formé que peu de boutons ; sur ceux laissés de 14 jours à 20 jours à la lumière, on observe en fin d'expérience de nombreux méristèmes encore à l'état de mamelons sur le cal ; ce n'est que pour les cultures laissées 22 jours à la lumière avant le transfert à l'obscurité, que l'on observe des boutons en nombre égal au témoin.

Pour la seconde expérience examinée plus tard, il aura fallu maintenir 12 jours

PLANCHE XI. — Structure du cal formé au pôle proximal des fragments de hampe de Tabac cultivés *in vitro*.

1. Cal formé à l'obscurité après 65 jours de culture sur le milieu de base.
2. Cal formé à la lumière après 18 jours de culture sur milieu de base additionné de 1 mg/l de gibbérelline. *D* : dynamic wedge ; *e* : épiderme ; *Le* : liber externe ; *Li* : liber interne ; *Ln* : liber néoformé ; *Zg* : zone génératrice libero ligneuse ; *nc* : néocambium ; *X* : xylème ; *Xn* : xylème néoformé ; *pm* : parenchyme médullaire ; *Pn* : parenchyme néoformé ; *l* : liège.



seulement les fragments à la lumière pour que, en fin d'expérience, des boutons soient formés sur le cal en nombre identique à ceux formés sur le témoin laissé à la lumière.

Il semble alors que la période nécessaire d'exposition des fragments à la lumière corresponde à la phase d'organogenèse gemmaire. Il a été vérifié par des coupes histologiques que c'est lorsque les cals contiennent déjà les méristèmes gemmaires, que leur transfert à l'obscurité n'empêche pas les boutons de se former d'une manière analogue à celle observée sur les témoins laissés à la lumière.

C4) Action du glucose sur la néoformation des boutons floraux à l'obscurité.

Des fragments de hampe sont ensemencés sur des milieux contenant diverses concentrations de glucose. Les tubes sont portés soit à la lumière (3 500 lux jour long), soit à l'obscurité.

Deux expériences ont été faites de sorte que 30 tubes ont été placés dans chacune des conditions (tableau XI).

TABLEAU XI

*Néoformation des boutons à la lumière et à l'obscurité,
en fonction de la concentration en glucose du milieu*

Concentration glucose en g/l	0	7,5	15	30	50	75	100
Moyenne boutons par fragment exposé à la lumière	cal	2,5	7,5	10,7	12	8	1,3
Moyenne boutons par fragment exposé à l'obscurité	pas de cal	léger cal	0,1	0,35	1,1	0,5 (1 fleur épanouie)	pas de cal ou léger cal

A l'obscurité et sans sucre, les fragments ne réagissent pas, il n'y a pas de cal.

La concentration optimale de glucose pour la néoformation des boutons est la même à la lumière et à l'obscurité.

Le nombre moyen de boutons formés à l'obscurité demeure inférieur au nombre moyen de boutons observés à la lumière. On peut cependant remarquer que pour la concentration optimale de sucre, le nombre de boutons formés atteint à l'obscurité une moyenne voisine de un par fragment.

Il ressort de ces expériences qu'à partir des fragments de hampe cultivés *in vitro*, l'organogenèse florale peut s'accomplir à l'obscurité jusqu'à la fleur épanouie, mais le nombre de boutons formés est faible ; cependant une moyenne de 1 bouton par fragment peut être atteinte pour une concentration optimale de glucose : cette moyenne reste environ 10 fois inférieure à la moyenne des boutons formés à la lumière sur la même concentration de sucre.

A l'obscurité, il n'y a donc pas inhibition de la floraison des fragments de hampe, mais réduction du nombre de boutons formés. La lumière semble donc intervenir dans la première phase de l'organogenèse, c'est-à-dire dans la formation des îlots méristématiques dans le cal.

IV. — MODIFICATIONS APPORTÉES PAR L'ADJONCTION AU MILIEU DE SUBSTANCES DE CROISSANCE

A. Action de la kinétine et de l'auxine sur l'organogenèse florale

Les concentrations de kinétine et d'auxine utilisées sont, par litre, 0,01 mg, 0,1 mg, 1 mg et 10 mg. Les fragments ensemencés sont tous des fragments de hampe. En fin de culture, les explantats sont examinés, les apex disséqués, mais le nombre de bourgeons formés n'a pas toujours été compté. Les cultures sont laissées en expérience 2 mois, parfois plus longtemps, et jusqu'à 4 mois lorsque des concentrations élevées de kinétine sont utilisées.

A₁) Résultats généraux concernant l'organogenèse

Trois expériences ont été faites en combinant diverses concentrations de kinétine et d'auxine ajoutées au milieu de base (30 g/l de glucose). Les résultats communs à chacune de ces expériences sont groupés dans la figure 3.

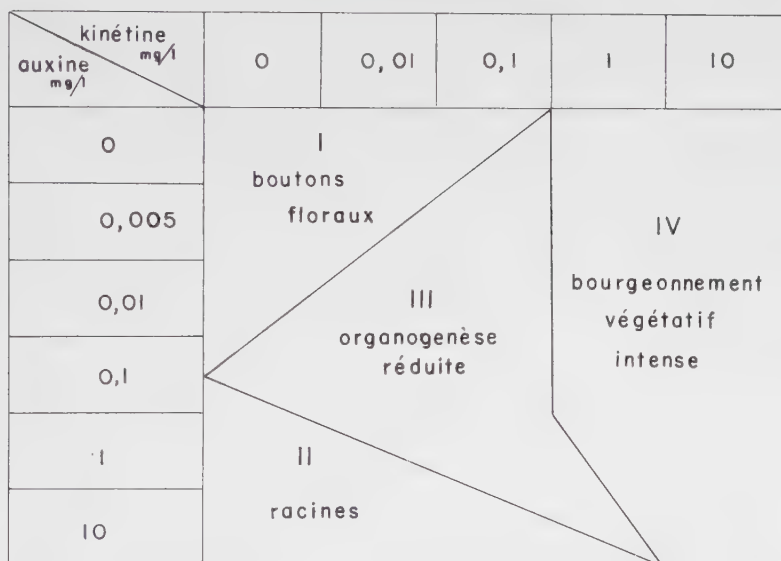


FIG. 3. — Représentation schématique de l'action de la kinétine et de l'auxine sur le comportement des fragments de hampe florale cultivés sur le milieu contenant 30 g/l de glucose.

Pour la région I de la figure correspondant aux plus faibles concentrations d'auxine et de kinétine, l'aspect des fragments de hampe en fin d'expérience est celui des témoins ; en particulier, le nombre de boutons formés sur le cal basal est du même ordre de grandeur.

Pour la région II de la figure, correspondant aux fortes concentrations d'auxine et aux faibles concentrations de kinétine, les fragments prolifèrent et forment des racines.

Pour la région III de la figure, l'organogenèse gemmaire ou radiculaire est réduite.

Pour la région IV correspondant aux fortes doses de kinétine, un abondant bourgeonnement est provoqué quelle que soit la concentration d'auxine.

Les fragments de hampe réagissent à l'addition de kinétine et d'auxine comme les tissus repiqués de Tabac ou les fragments de tige, en formant selon les concentrations, des bourgeons, des racines ou un cal.

La formation des boutons floraux est seulement maintenue pour les faibles concentrations des deux substances de croissance :

— L'auxine inhibe la formation des boutons sur les fragments de hampe, de même qu'elle inhibe la caulogenèse sur les fragments de tige de la même variété « W.38 » de Tabac. Avec les concentrations utilisées, une action nette sur la floraison des bourgeons n'est pas trouvée.

— Pour les concentrations de 1 mg/l et 10 mg/l de kinétine les fragments sont recouverts de bourgeons dont certains seulement sont floraux. Cependant il a été observé que parfois un fragment soit recouvert de méristèmes floraux, ce qui indiquerait la possibilité du maintien de l'aptitude à fleurir des nombreux méristèmes formés par action de la kinétine.

A la suite de ces deux remarques, nous avons recherché, d'une part l'action de la kinétine seule, d'autre part l'action de l'auxine en présence de kinétine, sur l'organogenèse florale, en fonction de la teneur en sucre du milieu, facteur qui nous est apparu être limitant sur la floraison des bourgeons néoformés à partir des fragments de hampe.

A₂) Action de la kinétine en fonction de la teneur en sucre du milieu, sur l'aptitude à fleurir des bourgeons néoformés

Des fragments de hampe sont cultivés sur des milieux contenant 1 mg/l de kinétine et plusieurs concentrations de glucose 15, 30, 50 et 75 g/l.

Dans les deux expériences faites, le comportement des fragments de hampe sur 15 g/l, 50 g/l et 75 g/l de glucose est analogue :

— pour 15 g/l de glucose, de nombreux bourgeons végétatifs aux feuilles arrondies se sont formés.

— pour 50 g/l de glucose, il y a formation de nombreux méristèmes floraux, en nombre supérieur au témoin : les boutons sont si serrés sur le cal qu'il devient impossible de les compter.

— pour 75 g/l, la prolifération est irrégulière, de nombreux fragments ne réagissent pas ; si des bourgeons se forment, ils sont floraux.

Par contre sur la concentration habituelle de 30 g/l de glucose, les deux expériences n'ont pas donné de résultats analogues : dans l'une, en accord avec les résultats exposés précédemment, la majorité des bourgeons néoformés ne fleurit pas ; dans l'autre, les bourgeons néoformés sont déjà tous floraux. Cette dernière concentration de sucre apparaît donc limite sur la floraison des méristèmes néoformés en présence de kinétine.

L'aptitude précoce à la floraison des bourgeons néoformés sur les fragments de hampe est maintenue si le milieu contient suffisamment de sucre, ce qui montre encore ici qu'en présence de kinétine, c'est la concentration de sucre qui est le facteur déterminant de la floraison.

Par l'action conjuguée de la kinétine qui multiplie le nombre de points végétatifs, et de concentrations élevées de sucre, le nombre de boutons formés sur les fragments de hampe est augmenté.

A₃) Action conjuguée de l'auxine et de la kinétine sur l'aptitude à fleurir des bourgeons néoformés.
Influence de la teneur en sucre du milieu

En présence de concentrations de kinétine de l'ordre de 1 à 10 mg/l le bourgeonnement est maintenu pour les concentrations d'auxine même supérieures à 0,01 mg/l.

Les bourgeons formés alors sur le milieu contenant 30 g/l de glucose sont le plus souvent végétatifs. Les bourgeons obtenus sur le milieu contenant 10 mg/l de kinétine et 0,1 mg/l d'auxine ont été étudiés d'une manière plus approfondie. Ces bourgeons ont un axe allongé mince et des feuilles vertes arrondies ; ils sont transparents, cassants, fragiles ; le fragment disparaît sous leur profusion (Pl. XII, 1).

L'étude histologique (AGHION, 1964) a montré que les méristèmes des bourgeons sont peu colorables, leur organisation est rudimentaire (Pl. XII, 2). On distingue deux assises tunicales dont les cellules vacuolisées sont peu nombreuses, un corpus réduit et le méristème médullaire. Les caractères juvéniles décrits sont ceux des apex des plantules de Tabac.

Une expérience préliminaire pour étudier l'action de la concentration de glucose sur l'aptitude à fleurir des bourgeons néoformés en présence de kinétine et d'auxine a été faite dans les conditions suivantes :

Quatre séries de milieux sont préparés, contenant par litre 15, 30, 50 et 75 g de glucose. A chacun de ces milieux sont ajoutés les doses suivantes d'auxine et de kinétine :

Kinétine		Auxine
1 mg/l	+	0,005 mg/l
5 mg/l	+	0,01 mg/l
1 mg/l	+	1 mg/l
10 mg/l	+	1 mg/l

La floraison des bourgeons néoformés sur les fragments de hampe ensemencés sur ces différents milieux est indiquée dans le tableau suivant (tableau XII).

TABLEAU XII

Bourgeonnement des fragments de hampe sur milieux contenant de la kinétine et de l'auxine, sur plusieurs concentrations de glucose

Concentration de kinétine et d'auxine en mg/l	Concentration de glucose en g/l			
	15	30	50	75
Kinétine 1, Auxine 0,005..... (69 jours)	bourgeons	boutons	boutons	boutons
Kinétine 5, Auxine 0,01 (76 jours)	bourgeons	bourgeons	boutons	—
Kinétine 1, Auxine 1 (69 jours)	bourgeons	cal	cal	cal
Kinétine 10, Auxine 1 (69 et 120 jours)	bourgeons	bourgeons	bourgeons	boutons

— pour les concentrations de 1 mg/l de kinétine + 0,005 mg/l d'auxine le cal apparaît recouvert de boutons floraux ; il en a été compté jusqu'à 40 par fragment, lorsque le milieu contient 30 et 50 g/l de glucose.

— pour les concentrations de 5 mg/l de kinétine + 0,01 mg/l d'auxine, de nombreux bourgeons végétatifs sont observés sur 15 et 30 g/l de sucre. Pour 50 g/l de glucose des bourgeons anormaux formés d'un axe blanchâtre sont terminés par un apex floral ; les fragments cultivés sur 75 g/l de glucose sont tous morts dans cette expérience.

— pour les concentrations de 1 mg/l de kinétine + 1 mg/l d'auxine, le bourgeonnement ne se fait que sur 15 mg/l de glucose ; il est végétatif.

— pour les concentrations de 10 mg/l de kinétine + 1 mg/l d'auxine, le bourgeonnement est intense ; la floraison des bourgeons n'est observée que sur la concentration de glucose la plus forte soit 75 g/l ; sur cette concentration de nombreux fragments sont morts ; sur ceux qui prolifèrent il a été compté jusqu'à 23 boutons sur un cal.

En conclusion, on peut dire que par apport exogène de concentrations variées de kinétine et d'auxine, les deux types d'organogenèse, caulogenèse et rhizogenèse, décrits par les auteurs, sont également obtenus à partir de la culture des fragments de hampe ; de plus, toutes autres conditions étant identiques par rapport aux expériences témoins, notamment la concentration de glucose, l'apport de substances de croissance modifie le devenir des bourgeons néoformés, perturbant ainsi le gradient axial de propension à la floraison.

L'addition de kinétine au milieu provoque sur les fragments de hampe l'augmentation du nombre des points végétatifs ; pour les faibles doses de sucre, les bourgeons néoformés sont végétatifs ; pour les doses optimales de sucre, ils sont floraux ; le nombre de bouton est alors augmenté.

L'auxine ajoutée seule inhibe la caulogenèse ; en présence de kinétine, le bourgeonnement est maintenu. Mais sur les concentrations de sucre qui permettent habituellement la floraison, les bourgeons néoformés restent juvéniles. Des concentrations de glucose élevées, souvent alors toxiques, qui inhibent le bourgeonnement végétatif, semblent pouvoir rétablir la floraison.

Ajoutons quelques mots sur les bourgeons néoformés à l'obscurité : un abondant bourgeonnement des fragments de hampe à l'obscurité est obtenu avec les concentrations suivantes de substances de croissance : kinétine 1 mg/l + auxine 0,005 mg/l, kinétine 10 mg/l + auxine 0,1 et 1 mg/l lorsque le milieu contient 15, 30 et 50 g/l de glucose. Lorsque le milieu contient 75 g/l de glucose le bourgeonnement est inhibé, quelques boutons sont observés (kinétine 1 mg/l + auxine 0,005 mg/l).

B. Action de l'acide gibbéréllique

Dès 1961 nous avons constaté l'action inhibitrice de l'acide gibbéréllique (GA_3) sur la néoformation des boutons par les fragments de hampe inflorescentielle de Tabac.

PLANCHE XII. Modifications apportées à l'aspect des néoformations à partir des fragments de hampe de Tabac « W. 38 » par l'adjonction au milieu de 10 mg/l de kinétine et 0,1 mg/l d'auxine.

1. Aspect des bourgeons néoformés.

2. Coupe longitudinale dans l'apex d'un bourgeon néoformé. (Col. hématoxyline) (G. 220).



Nous avons confié en 1963 la poursuite de ce travail à Mme MOTAMED ; après son départ en Iran, nous avons continué et précisé ces recherches. C'est l'ensemble des résultats obtenus que nous exposons.

B₁) Action primaire de GA₃ sur l'organogenèse

1. ACTION DE 1 mg/l DE GA₃ : INHIBITION DE L'ORGANOGENÈSE FLORALE

GA₃ à la concentration de 1 mg par litre est ajouté au milieu de culture avant ou après l'autoclavage. Dans l'un et l'autre cas les résultats notés après 45 jours de culture sont identiques : un cal plus volumineux que les cals des témoins s'est formé au pôle basal des fragments de hampe.

	Nombre de fragments cultivés	Nombre de boutons observés
GA ₃ non autoclavé	40	0
GA ₃ autoclavé	100	0

Cependant la présence sporadique sur les cals formés, de quelques bourgeons végétatifs est à noter.

L'absence des boutons en fin de culture pouvait être due soit au non développement d'ébauches gemmaires qui seraient formées dans le cal, soit à l'absence même de ces méristèmes.

L'observation histologique a mis en évidence (Pl. XI, 2) l'absence d'ilôts méristématiques dans le cal, le grand développement du «dynamic-wedge», la lignification abondante des tissus (les échantillons sont très durs à déliter).

L'acide gibbéréllique à la concentration de 1 mg/l ne permet donc que le déroulement de la phase histogène, il n'y a pas alors de phase organogène.

Ces observations nous ont conduite à rechercher les limites de concentration de GA₃ efficaces sur l'inhibition de la néoformation des boutons floraux, et aussi à rechercher si GA₃ inhibe également la formation des racines provoquée par l'adjonction d'auxine au milieu.

2. CONCENTRATIONS EFFICACES D'ACIDE GIBBÉRELLIQUE SUR L'INHIBITION DE L'ORGANOGENÈSE FLORALE

20 fragments de hampes ont été cultivés sur chacune des concentrations de gibbérélline (GA₃) suivantes : 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 1 mg/l. Les résultats sont portés sur la figure 4.

Dès la concentration de 0,03 mg/l le nombre moyen de boutons formés est diminué de moitié ; pour la concentration de 0,1 mg/l de GA₃ le nombre moyen de boutons formés est inférieur à 1, il est nul à partir de 0,4 mg/l de GA₃, soit pour environ la concentration 10⁻⁶ M et jusqu'à la plus forte concentration utilisée.

Pour les faibles concentrations de GA₃, inférieures à 10⁻⁶ M quelques bourgeons végétatifs se sont formés sur les cals.

3. ACTION DE GA₃ SUR LA RHIZOGENÈSE : INHIBITION

La formation de racines à partir des fragments de hampe est provoquée par l'adjonction au milieu de 10 mg/l d'auxine.

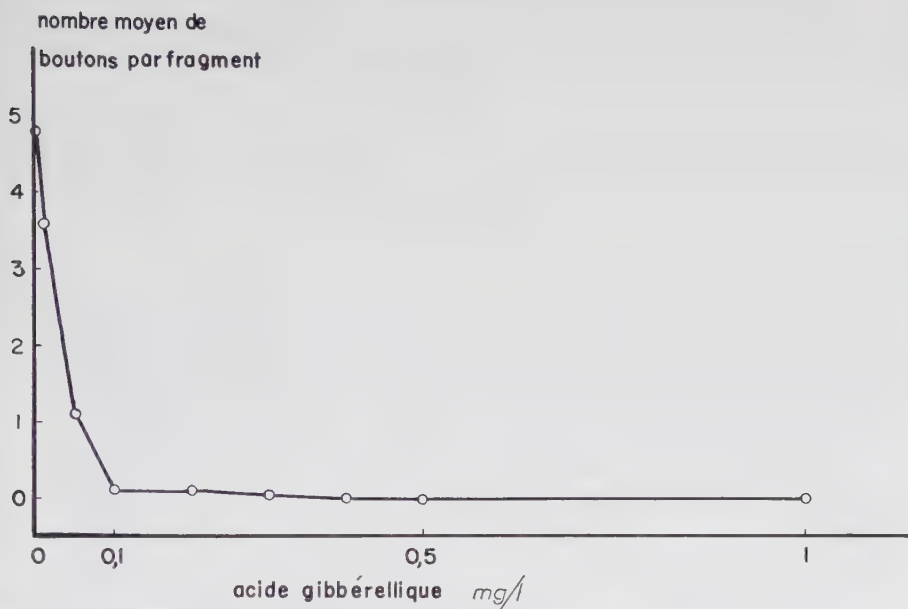


FIG. 4. — Inhibition de la néoformation des boutons à partir des fragments de hampe florale de Tabac « W. 38 » en fonction de la concentration d'acide gibbérellique.

Si l'on ajoute à ce milieu de la gibbérelline (GA_3) le fragment prolifère mais l'organogenèse radriculaire est inhibée.

Une concentration 10 fois supérieure à celle utilisée pour obtenir l'inhibition des boutons est nécessaire : les concentrations utilisées étaient 0,1, 0,5, 1 et 5 mg/l de GA_3 : seule la dernière concentration a permis l'inhibition totale des racines.

Lorsque les fragments de hampe sont ensemencés sur un milieu contenant de l'acide gibbérellique, l'organogenèse gemmaire ou radriculaire est inhibée.

Agissant en début de culture, sur des fragments d'organes isolés, alors que les processus de dédifférenciation cellulaire conduisant à l'organogenèse n'ont pas commencé, l'action primaire de GA_3 est d'inhiber la formation des îlots méristématiques préalables à toute organogenèse, ne permettant alors que le déroulement de la phase histogène.

L'observation de quelques bourgeons, alors végétatifs, sur les fragments cultivés sur les faibles concentrations de GA_3 , ainsi que la formation sporadique de tels bourgeons dans le cas des concentrations les plus fortes utilisées, nous amène à rechercher l'action exercée par GA_3 au cours du déroulement de l'organogenèse, alors que les processus conduisant à la néoformation des boutons floraux sont successivement engagés.

B₂) Action de GA_3 au cours du déroulement de l'organogenèse florale

Nous avons étudié l'action de GA_3 sur des fragments venant d'être ensemencés et n'ayant par conséquent pas commencé les processus de la prolifération cellulaire préalable à l'organogenèse et à la floraison. Nous allons étudier l'action de GA_3

après passage des fragments sur le milieu habituel pendant un temps plus ou moins long, ce qui revient à étudier l'action de GA_3 à différents moments du déroulement de l'organogenèse florale.

Les fragments de hampe florale, initialement ensemencés sur le milieu de base habituel, sont transplantés par lots de 20, tous les trois jours, sur un milieu analogue additionné de 1 mg/l de GA_3 autoclavé avec le milieu ; les fragments de chaque lot sont alors maintenus sur ce milieu jusqu'à la fin de l'expérience.

Deux cals sont prélevés au moment de chaque transfert, l'étude histologique en est faite afin de connaître le stade de l'organogenèse atteint sans GA_3 à ce moment.

Trois expériences ont été réalisées dont les résultats sont concordants. En ce qui concerne l'expérience spécialement décrite, les transferts du milieu témoin sur le milieu contenant l'acide gibbérellique ont été faits après les durées suivantes : 0 jour, 3 jours, 6 jours, 9 jours, 11 jours, 14 jours, 16 jours, 20 jours.

L'ensemble des cultures a été examiné 49 jours après l'ensemencement.

DESCRIPTION DES CULTURES EN FIN D'EXPÉRIENCE

— L'observation superficielle des cultures (Pl. XIII, I) en fin d'expérience montre que les fragments provenant des différents lots peuvent présenter trois aspects principaux selon la date du transfert : avoir formé un cal, ou un cal et des bourgeons végétatifs aux feuilles allongées, ou encore un cal et des boutons floraux dont certains ont parfois une allure anormale avec modification du nombre des pièces florales et allongement du pédoncule.

— Le nombre moyen des bourgeons formés par fragment en fin d'expérience pour chaque lot de culture est représenté sur la figure 5.

Lorsque le temps de culture qui a précédé le transfert est inférieur à 4 jours, l'organogenèse observée après 45 jours de culture est faible ou nulle, comme lorsque le fragment est directement cultivé sur GA_3 . Lorsque les transferts sont faits après 4 jours à 9-12 jours de culture des bourgeons se forment ; ils sont végétatifs, leur nombre augmente jusqu'aux transferts faits les 9^e-12^e jours ; à partir de ce temps de transfert les premiers boutons floraux sont observés ; leur nombre augmente avec la durée de culture sur le milieu de base ayant précédé le transfert, tandis que décroît le nombre de bourgeons végétatifs. Après 21 jours de culture sur milieu témoin le transfert des cultures sur GA_3 est sans action sur le nombre respectif des boutons et des bourgeons.

STRUCTURE DES CALS AU MOMENT DE CHACUN DES TRANSFERTS SUR GA_3

L'action de GA_3 se manifeste de manière différente selon l'époque du transfert. GA_3 agit alors aux différentes étapes de l'organogenèse normalement atteintes au moment du transfert. Dans les conditions de l'expérience décrite, la structure du cal au moment de chaque transfert est la suivante :

3^e jour : pas encore de divisions cellulaires dans le fragment mis en culture.

6^e jour : la prolifération cellulaire est commencée et les cloisonnements de la future zone néo-cambiale débutent.

9^e jour : début des divisions de type méristématique primaire.

11^e jour : les méristèmes gemmaires sont individualisés dans le cal, et leur

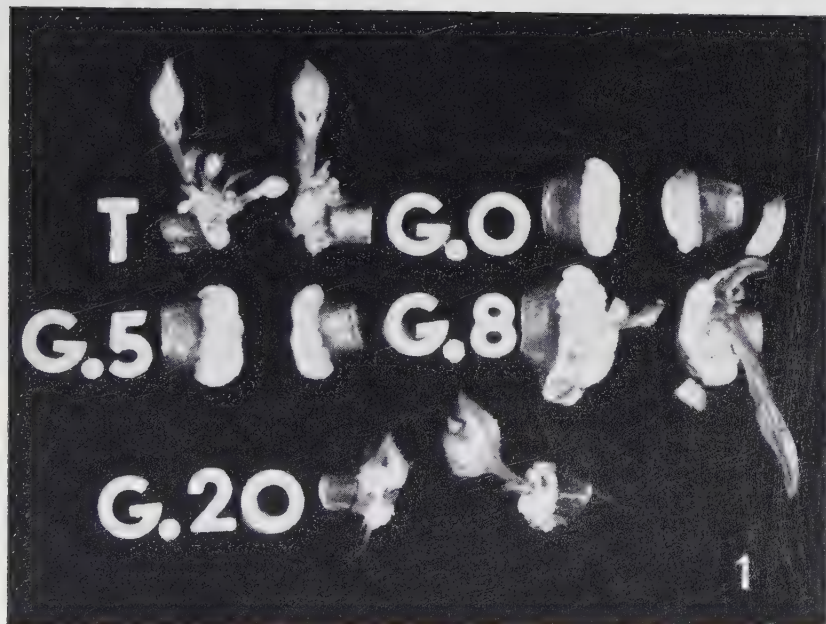


PLANCHE XIII. — Action de GA_3 sur l'organogenèse florale

T : fragment cultivé 47 jours sur le milieu de base,

*G*₀ : fragment cultivé 47 jours sur le milieu de base additionné de 1 mg/l de GA_3 ,

*G*₅, *G*₈, *G*₂₀ : fragments transférés du milieu de base sur le milieu contenant GA_3 après 5, 8 et 20 jours respectivement. La figure montre que *T* et *G*₂₀ portent des boutons, *G*₈ porte des bourgeons végétatifs, et *G*₀ et *G*₅ n'ont formé qu'un cal.

nombre est voisin du nombre moyen de bourgeons formés sur chaque fragment témoin en fin d'expérience. Un des méristèmes a déjà formé des primordiums.

14^e jour : les méristèmes gemmaires et les apex avec primordiums sont en nombre à peu près équivalent.

16^e jour : on peut observer dans les cals des méristèmes gemmaires, des apex avec primordiums, des apex floraux avec sépales et étamines différenciés.

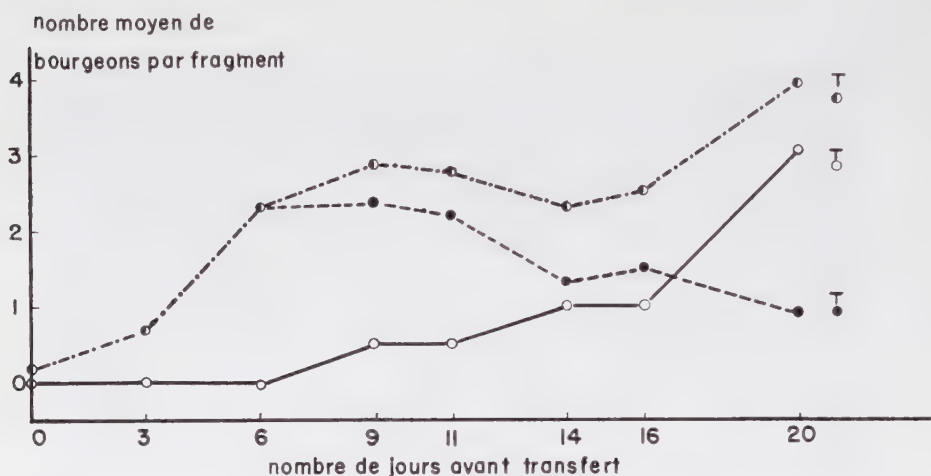


FIG. 5. — Action de l'acide gibbérellique ajouté en cours de culture, sur la néoformation des boutons à partir des fragments de hampe florale de Tabac « W. 38 ».

- — - — total des bourgeons végétatifs et floraux
- ——— boutons
- - - - bourgeons végétatifs.

A la lumière de ces observations, il résulte que :

Au temps 0 jour, GA_3 agit sur des fragments qui viennent d'être séparés de la plante-mère et qui sont directement ensemencés sur le milieu contenant GA_3 , alors que les processus de la prolifération cellulaire n'ont pas commencé.

Du temps 3, au temps 9-12 jours, GA_3 agit au cours du déroulement de la première phase organogène, c'est-à-dire au cours de la dédifférenciation cellulaire préalable à la formation des méristèmes gemmaires.

Du temps 10-12 jours, au temps 21 jours, le développement en boutons des méristèmes gemmaires se fait progressivement et successivement.

En résumé l'acide gibbérellique inhibe toute organogénèse (caulogénèse, rhizogénèse) lorsque les fragments sont ensemencés primitivement sur le milieu contenant GA_3 .

L'inhibition ne s'exerce que lorsque GA_3 agit dans les tout premiers jours de culture. Lorsqu'il agit au cours du déroulement de la dédifférenciation aboutissant à la formation des méristèmes primaires, le nombre de bourgeons formés en fin d'expérience est de plus en plus élevé au fur et à mesure que les transferts sont plus

tardifs, jusqu'à atteindre un optimum alors que ce sont des fragments contenant déjà les méristèmes qui sont transférés. L'acide gibbérellique n'empêche donc pas alors le développement des méristèmes formés. Mais en présence de GA₃, ceux-ci s'organisent en bourgeons végétatifs.

A partir des 10-12^e jours de culture préalable, GA₃ agit sur des méristèmes déjà formés, dont un nombre de plus en plus grand évolue normalement en boutons ; le résultat en fin d'expérience est que le nombre total de bourgeons reste à peu près constant ; le nombre de bourgeons végétatifs décroît tandis qu'apparaissent les premiers boutons ; le nombre de ceux-ci augmente corrélativement avec le nombre de méristèmes ayant différencié des organes floraux dans les cals au moment du transfert.

Par conséquent, à partir du moment où les méristèmes ont une certaine organisation, l'acide gibbérellique n'empêche pas ou ne retarde plus la floraison des bourgeons néoformés.

DISCUSSION

L'ensemble de nos résultats nous a amenée à considérer la notion d'étapes dans la réalisation des potentialités successives exprimées par les fragments d'organes au cours de la culture.

Dans le cas particulier de la culture des fragments de hampe de Tabac, l'étude histologique nous a permis de mettre en évidence trois grandes phases : la phase histogène, la phase organogène et la phase florale ; l'interprétation des expériences effectuées par la suite, a amené à considérer qu'elles sont chacune l'expression d'un contexte physiologique.

Ces trois étapes seront examinées successivement ; nous discuterons plus particulièrement de la phase florale, c'est-à-dire celle du devenir des méristèmes gemmaires ; les deux étapes préalables ayant été étudiées par de nombreux auteurs et particulièrement par SKOOG et ses collaborateurs, précisément sur le matériel que nous avons expérimenté.

PHASE HISTOGÈNE

Nous avons distingué une phase histogène située chronologiquement au début de la prolifération cellulaire consécutive à la mise en culture aseptique des fragments de hampe, cette phase est celle qui aboutit généralement à la formation des cals. Dans le cas plus particulier des fragments de hampe, le déroulement des processus de multiplication cellulaire qui conduirait à la néoformation des fleurs peut être arrêté à ce stade. On obtient alors un cal, dans lequel on distingue un cambium avec de part et d'autre du phloème et du xylème ; l'examen histologique montre que le cal ne renferme pas d'îlots méristématiques. Les potentialités exprimées alors sont donc seulement *histogènes*.

Au cours de l'exposé, nous avons vu que ce résultat a été obtenu en particulier lorsque auxine ou acide gibbérellique sont ajoutés au milieu, ou lorsque les cultures sont faites à l'obscurité, ou encore, lorsque de longs fragments sont utilisés, ou lorsque les fragments sont prélevés sur des hampes en cours d'élongation ; c'est-à-dire, sur

notre matériel, chaque fois que la prolifération cellulaire étant maintenue, l'organogenèse est inhibée. Ces conditions seront discutées plus loin dans leurs relations avec l'organogenèse.

PHASE ORGANOGÈNE

La phase organogène aboutit à la formation dans le cal de méristèmes primaires selon le processus général que BUVAT (1944) décrit comme une progressive différenciation cellulaire.

1° Au cours du déroulement des processus conduisant à la néoformation des fleurs par les fragments de hampe de Tabac, ce stade est réalisé lorsque des méristèmes gemmaires sont individualisés dans le cal. Ces méristèmes n'ont pas formé d'organes et l'agencement des cellules méristématiques ne permet pas de dire (du moins d'après l'étude qui en a été faite) si ces méristèmes sont floraux ou végétatifs. Nous les considérons à ce moment simplement comme des méristèmes de type gemmaire pour les distinguer des méristèmes de type racinaire.

2° D'ailleurs, jusqu'à ce stade, le devenir des méristèmes gemmaires semble pouvoir être influencé par l'environnement, de sorte que, sous l'influence d'un facteur externe, au lieu de poursuivre leur évolution en fleurs, ils se développent en bourgeons feuillés.

A ce stade, la potentialité organogène est apparente, mais pas la potentialité florale qui n'est pas encore exprimée.

3° Chez *Nicotiana Tabacum* « W.38 », SKOOG a montré que l'organogenèse est contrôlée par un équilibre des facteurs de croissance, notamment par l'auxine et la kinétine. Nous avons étudié l'action de ces deux facteurs sur la néoformation des fleurs et comparé les résultats avec ceux obtenus par SKOOG sur la néoformation des bourgeons à partir des fragments de tige de la même variété « W.38 ».

Les résultats sont concordants, kinétine et auxine contribuent de la même façon et pour des concentrations voisines à l'organogenèse à partir des fragments de tige et de hampe (inhibition de l'organogenèse gemmaire par l'auxine, restauration par la kinétine). Il est donc probable que ces substances interviennent là, sur le phénomène de la néoformation des méristèmes gemmaires, et que, au cours du déroulement des processus qui conduisent à la néoformation des fleurs, on puisse distinguer une étape commune à la néoformation des méristèmes caulinaires ou floraux.

Un même parallélisme d'action a été retrouvé lorsque l'acide gibbérellique a été utilisé. MURASHIGE (1964) a montré que l'acide gibbérellique inhibe à la concentration 10^{-6} M la néoformation des bourgeons à partir des cals repiqués de Tabac « W.38 ». Nous avons montré que pour la même concentration, GA_3 inhibe la néoformation des boutons floraux à partir des fragments de hampe. MURASHIGE de son côté, et nous du nôtre, avons montré que GA_3 utilisé à une concentration plus élevée, empêche aussi la rhizogenèse provoquée sur les deux matériels cités. Dans les deux cas, cette inhibition de l'organogenèse est liée au ralentissement ou à la non formation d'ilôts méristématiques dans le cal, alors que la prolifération cellulaire se poursuit et que l'activité cambiale et histogène est maintenue. On peut supposer alors que GA_3 agit sur le phénomène même de la multiplication cellulaire préalable à l'organogenèse.

Cependant, dans d'autres cas, l'acide gibbérellique utilisé à des concentrations voisines peut favoriser *in vitro* la formation d'organes, par exemple, la rhizogenèse

à partir des cultures de Topinambour faites à l'obscurité (SPANJERSBERG et GAUTHERET, 1964). Ceci montre que l'on ne peut actuellement généraliser une interprétation dans le domaine complexe de l'interaction des substances de croissance sur l'organogénèse, alors qu'une même substance agit différemment sur des plantes différentes.

Au cours de l'étude de l'influence de la lumière, nous avons, comme à chaque fois qu'un facteur de l'environnement était étudié, essayé de distinguer une action de ce facteur sur le bourgeonnement, d'une action sur la mise à fleur des méristèmes. La comparaison des cultures faites à l'obscurité et à la lumière sur le milieu témoin (dépourvu de substances de croissance), nous a amenée à conclure que dans nos conditions expérimentales, la lumière était d'abord nécessaire au déroulement de la phase organogène, c'est-à-dire à la néoformation des îlots méristématiques dans le cal, qu'ils soient formés à partir de tige ou de hampe, à destinée végétative ou florale.

Par ailleurs, d'après les études actuelles de SPANJERSBERG et GAUTHERET (1963) la lumière est nécessaire à la néoformation des racines à partir des tissus de Topinambour. Rappelons ici également que dans le cas des cultures de Tabac faites en présence de kinétine et d'auxine, le bourgeonnement peut se produire à l'obscurité.

On sait que SKOOG considère que c'est l'équilibre de plusieurs et mêmes facteurs de croissance, qui détermine l'orientation vers la rhizogénèse ou la caulogénèse, alors que GAUTHERET (1950) et BOUILLENNE (1950) font intervenir aussi dans ce déterminisme des facteurs spécifiques. Nos essais, bien qu'encore incomplets suggèrent que ce déterminisme se déroule par stades successifs et s'oriente sous l'effet de diverses substances au cours de ces stades.

4^o Bien qu'un gradient axial organogène ait pu être mis en évidence, l'aptitude à former des méristèmes gemmaires semble être une potentialité des tissus de Tabac, sans qu'intervienne la notion d'âge de la plante : les tissus d'embryons, de jeunes plantes, de plantes fleuries, bourgeonnent. D'ailleurs le bourgeonnement peut être maintenu ou provoqué à partir des tissus repiqués de Tabac (SKOOG et MILLER, 1957).

PHASE FLORALE. DEVENIR DES MÉRISTÈMES NÉOFORMÉS

1^o Le devenir des méristèmes gemmaires néoformés à partir des fragments de tige de Tabac semble lié particulièrement à l'âge de la plante et au site de prélèvement, c'est-à-dire au niveau de la plante à partir duquel le cal se forme *in vivo* et *in vitro*.

Les fragments de hampe paraissent avoir toutes les potentialités ; à partir d'eux, des racines, des bourgeons juvéniles, des bourgeons adultes, des fleurs peuvent se former tandis qu'à partir des fragments de tige cultivés dans les mêmes conditions il n'a été obtenu que des racines et des bourgeons d'abord feuillés. Un gradient axial de l'aptitude à fleurir des bourgeons néoformés a pu être mis en évidence ; ce gradient paraît exprimer une acquisition des potentialités des tissus internes de la tige au cours de l'ontogénèse — potentialités exprimées normalement par les bourgeons terminaux et axillaires de la plante.

Des études récentes faites sur l'endive (PAULET et NITSCH, 1964a ; NITSCH et NITSCH, 1964 et MARGARA, 1965) montrent que tous les tissus de cette plante qui bourgeonnent peuvent fleurir. Le caractère de localisation, c'est-à-dire les particularités du gradient d'aptitude à la floraison retrouvé chez plusieurs variétés de Tabac, ne semble pas pouvoir être généralisé sous sa forme brute.

Cependant, on peut remarquer une part d'analogie entre les deux phénomènes : chez l'Endive comme chez le Tabac, il faut une certaine préparation physiologique pour que les méristèmes gemmaires néoformés soient capables de fleurir ; dans un cas, il faut une certaine vernalisation préalable des races tardives de l'Endive, dans un autre, il faut une floraison déjà effective de la hampe des Tabacs. Pourtant le Tabac peut exprimer au plus haut point l'aptitude florale jusqu'à donner directement une fleur à partir d'un méristème néoformé tandis que l'Endive forme des capitules surmontant un axe muni de quelques feuilles ou bractées.

A une époque où les techniques de culture permettent d'obtenir des embryons à partir de cellules isolées ou de très petits groupes de cellules (STEWART et coll., 1963), nous remarquons que dans tous les cas où des fleurs néoformées ont été signalées, ces fleurs se forment à partir d'assez gros explantats primaires de tissus différenciés.

Cette remarque nous amène à considérer la notion de substances contenues dans les fragments, responsables de la floraison des méristèmes. La notion d'un facteur spécifique de la floraison, le « florigène », d'abord plausible dans le cas des néoformations de fleurs chez le Tabac, en raison de la localisation, nous est apparue plus difficile à envisager après d'autres résultats que voici :

- le fait que les méristèmes néoformés sur les plus petits fragments de hampe fleurissent d'emblée, plus rapidement que lorsque les fragments utilisés sont plus longs ;
- la floraison possible bien que moins fréquente des bourgeons feuillés néoformés sur la tige de Tabac ;
- la floraison des bourgeons néoformés à partir de la racine d'endive ;
- l'échec rencontré dans des expériences préliminaires non mentionnées ici, essayant d'induire la floraison des bourgeons néoformés sur les fragments de tige de Tabac par greffage de ces fragments avec des fragments de hampe.

2° La technique de culture *in vitro* permet d'utiliser un milieu de culture contrôlé, qui nous a permis de mettre en évidence que la teneur en sucre du milieu est le facteur limitant de la floraison des méristèmes gemmaires néoformés à partir des fragments de hampe de Tabacs indifférents au photopériodisme. Il semble en être de même chez l'Endive (cultivée en eupériode), du moins dans le cas des cultures de tige (MARGARA, 1965).

L'importance de la nutrition carbonée dans la floraison des végétaux avait été signalée très tôt avant la découverte des facteurs spécifiques de la floraison. Son action sur la phase reproductrice est également soulignée par les auteurs travaillant sur les végétaux inférieurs, notamment en culture aseptique (SUSSEX et STEEVES, 1958 ; ALLSOPP, 1964).

De plus chez le Tabac, le gradient axial de propension à fleurir des méristèmes néoformés, décrit pour une valeur moyenne de sucre, est estompé de deux manières pour les valeurs extrêmes : pour les doses très faibles ou nulles de sucre, presque tous les bourgeons néoformés sont végétatifs, pour les doses fortes de sucre qui inhibent le bourgeonnement végétatif, tous les bourgeons qui apparaissent sont floraux, ils sont seulement plus nombreux et plus directement floraux vers les régions inflorescentielles de l'axe, que vers les régions plus proximales.

Les rôles des substances dites hormonales dans la floraison *de novo* est difficile à saisir puisque ces substances agissent d'abord sur l'organogenèse. Il nous a néan-

moins été possible de montrer que l'auxine (associée à la kinétine), et l'acide gibbérannique ajouté en cours de culture, perturbent la floraison des méristèmes néoformés chez le Tabac.

L'action observée de l'auxine est en accord avec l'hypothèse d'un rôle inhibiteur de l'auxine sur la floraison, repris par PAULET dans le cas des méristèmes néoformés de l'Endive. Cependant, remarquons à ce propos que chez le Tabac, l'adjonction de sucre au milieu a restauré dans plusieurs cas, la floraison empêchée par l'auxine associée à la kinétine.

L'empêchement de la floraison des méristèmes provoqué par l'acide gibbérannique sur le Tabac rappelle que certains auteurs (ROBBINS, 1957 ; 1960) ont comparé l'effet de cette substance à celui d'une hormone juvénile. Mais bien au contraire dans le cas de l'Endive, des expériences ont montré que l'acide gibbérannique favorise la floraison *in vitro* (PAULET et NITSCH, 1964b) comme d'ailleurs *in vivo* (RAPPAPORT et BONNER, 1960).

Les expériences réalisées ne nous paraissent pas à l'heure actuelle suffisantes pour attribuer à ces substances un rôle spécifique, déterminant, sur la floraison *de novo*. Notons aussi que l'on tend actuellement à considérer que certains composés phénoliques, sous réserve de l'ambivalence de ces composés, ont une action sur la floraison des bourgeons néoformés (PAULET et NITSCH, 1964 a, b).

3) Ce qui distingue les méristèmes terminaux et axillaires de plantes entières, des méristèmes néoformés dans un cal (*in vitro* ou à partir des tératomes), c'est aussi qu'ils ne sont pas (ou moins) soumis aux corrélations de la plante, corrélations d'origine apicale, corrélations d'origine foliaire.

Le rôle possible de la dominance apicale dans la mise à fleur a été souligné récemment par CHOUARD (1964). Celui-ci a été amené à constater en effectuant un examen comparatif des facteurs vicariants de la vernalisation, que plusieurs facteurs qui conféraient l'aptitude à la floraison agissent aussi sur la dominance apicale, soit en supprimant cette dominance définitivement, soit en l'abaissant temporairement, soit en la surmontant par activation des méristèmes inhibés.

Dans la dominance apicale interviennent des facteurs hormonaux et aussi des facteurs trophiques (CHAMPAGNAT, 1961). La conséquence de cette dominance est que les méristèmes axillaires, non dormants, mais dont la croissance est empêchée, élaborent des initiums foliaires et prennent une structure d'apex végétatif ; ils ne sont plus cet ensemble de cellules entièrement méristématiques qu'est un jeune bourgeon axillaire. Or la levée de la dominance apicale par des amputations appropriées chez le *Geum* ou chez *Scrofularia arguta* suffit à conduire vers la floraison les très jeunes bourgeons axillaires mais pas les plus âgés.

Alors que la jeune plante forme habituellement des feuilles avant de fleurir, certains méristèmes néoformés dans un cal, aussi bien d'ailleurs que certains méristèmes axillaires, peuvent fleurir d'emblée ; or nous remarquons que ce qui distingue l'apex d'un bourgeon terminal d'un méristème gemmaire néoformé dans un cal est que, dans le premier cas, dès la germination ou même dans l'embryon ou bien dans les méristèmes axillaires d'un rang assez élevé, de jeunes feuilles sont normalement placées immédiatement sous l'apex, tandis que les méristèmes gemmaires néoformés (ou axillaires) sont dépourvus à un certain moment d'initium foliaire.

Cependant l'ablation des feuilles normalement placées immédiatement sous un apex ne suffit ordinairement pas pour que l'apex végétatif considéré se transforme en apex floral. Ce cas se présente lorsque des apex isolés sont cultivés *in vitro*. Le

dôme apical, lorsqu'il est isolé, dépourvu de primordium foliaire et des tissus différenciés sous-jacents, structure que l'on peut comparer à celle d'un méristème gemmaire, n'est pas capable d'une croissance appréciable, ce qui a été interprété par les auteurs comme résultant d'une faible capacité de synthèse (WETMORE, 1954 ; BALL, 1960). Par contre, lorsque 1 ou 2 primordiums foliaires demeurent associés à l'apex isolé, cet apex *in vitro* forme de nouvelles feuilles, pousse végétatif et peut finalement fleurir.

Chacun des facteurs qui interviennent dans la floraison *in vitro* des méristèmes néoformés, considéré séparément, ne suffit pas à expliquer une telle aptitude à fleurir. Nous pensons que l'on doit attribuer la floraison précoce *de novo* à l'existence simultanée de plusieurs de ces facteurs favorables : les méristèmes gemmaires ne sont pas soumis aux corrélations de la plante entière ; formés *de novo* ils passent au cours de leur structuration par un stade critique où ils n'ont pas encore formé d'organes appendiculaires ; les facteurs du milieu leur sont transmis par les tissus différenciés du cal et de l'explantat initial, eux capables de créer l'équilibre des facteurs nécessaires à la floraison.

*
* *

Cet ensemble de réflexions suggère que la notion de maturité de floraison ou d'aptitude à fleurir existe aussi dans les tissus internes de la plante avant qu'ils aient formé des bourgeons ; cette maturité qui est acquise plus ou moins précocement au cours de l'ontogenèse, lorsque sont réalisées les différentes exigences physiologiques de la plante, pourrait être considérée comme l'acquisition d'un niveau suffisant de capacité de synthèse cellulaire ; il est possible d'ailleurs que ce niveau puisse être élevé par apport de substances exogènes.

Cette potentialité des tissus internes ne supprime pas le besoin d'un stimulus photoinducteur chez les plantes de grandes exigences photopériodiques ; chez de telles plantes, l'exigence photopériodique peut masquer la potentialité florale interne. Chez les plantes plus ou moins indifférentes au photopériodisme ou chez certaines plantes en eupériode lorsqu'elles sont capables de percevoir cette eupériode par des tissus non foliaires, la potentialité de fleurir, latente dans les tissus internes, s'exprime sans obstacle lors de la néoformation des méristèmes gemmaires alors que ceux-ci ne possèdent encore aucun organe appendiculaire ; il en résulte l'évolution d'emblée florale de tels méristèmes.

La fleur résultant peut alors être considérée comme une entité, elle est affranchie d'un système feuillé, affranchie d'un système racinaire ; ces deux systèmes feuille-racine sont remplacés par un tissu sous-jacent possédant des capacités suffisantes de synthèse et par le milieu de culture fournissant notamment l'énergie.

REMERCIEMENTS

Ces recherches ont été poursuivies sous la direction de M. le Professeur CHOUARD ; je suis heureuse de pouvoir lui exprimer ici ma gratitude pour l'intérêt qu'il a constamment porté à ces travaux ; ses conseils et encouragements m'ont permis d'aboutir à cette thèse dont il m'a fait l'honneur de présider le Jury.

J'exprime ma reconnaissance à M. le Professeur ULRICH ainsi qu'à M. MOREL, Directeur de Recherche à l'INRA, qui ont bien voulu accepter de participer à ce jury.

Je remercie M. le Professeur MOYSE pour la bienveillance qu'il m'a témoignée.

Que M. BEAUCHESNE qui m'a encouragée par ses conseils et son amitié trouve ici l'expression de mes sincères remerciements, ainsi que le personnel des Laboratoires du Phytotron et d'Angers.

Je remercie enfin MM. le Directeur et Administrateurs du C.N.R.S. pour l'aide matérielle qui m'a permis d'effectuer ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

- AGHION D., 1962. – Conditions expérimentales conduisant à l'initiation et au développement de fleurs à partir de la culture stérile de fragments de tige de Tabac. *C.R. Acad. Sc.*, **255**, 993-995.
- AGHION D., 1963 – Néoformation de bourgeons floraux sur des fragments de hampe inflorescentielle de Tabac en culture stérile. *Bull. Soc. bot. France*, **110**, 141-142.
- AGHION D., 1964 – Diversité d'organisation et de développement des méristèmes formés sur des fragments de hampe florale de Tabac. *Revue Cytol. Biol. vég.*, **27**, 315-318.
- AGHION-PRAT D., 1965 – Essai d'une interprétation physiologique des étapes de l'organogenèse florale *de novo* chez *Nicotiana Tabacum* L. *Bull. Soc. fr. Physiol. vég.* (sous presse).
- ALLSOPP A., 1964 – The metabolic status and morphogenesis. *Phytomorphology*, **14**, 1-27.
- BALL E., 1946 – Development in sterile culture of stem tip and subjacent regions of *Tropaeolum majus* L. and of *Lupinus albus* L. *Amer. J. Bot.*, **33**, 301-318.
- BALL E., 1960 – Sterile culture of the shoot apex of *Lupinus albus*. *Growth*, **24**, 91-110.
- BLONDON F., 1964 – Action de la nutrition minérale sur la floraison. *Bull. E.N.S.A.*, Nancy, **6**, 101-103.
- BONNAND J., 1956 – Le point végétatif de *Nicotiana Tabacum* L. aux diverses phases de son développement. *C.R. Acad. Sc.*, **242**, 1209-1212.
- BONNAND J., 1959 a – Transformation de l'apex végétatif de *Nicotiana Tabacum* L. (variété White Burley) en apex inflorescentiel. *C.R. Acad. Sc.*, **248**, 1209-1211.
- BONNAND J., 1959 b – *Nicotiana Tabacum* L. Point végétatif et morphologie. *Rev. Cytol. Biol. Vég.*, **20**, 187-228.
- BOUILLENNE A., 1950 – La rhizogenèse. *Ann. biol.*, **54**, 597-621.
- BRAUN A.C., 1953 – Bacterial and host factors concerned in determining tumor morphology in crown-gall. *Bot. Gaz.*, **114**, 363-373.
- BRAUN A.C., 1959 – A demonstration of the recovery of the crown-gall tumor cell with the use of complex tumors of single-cell origin. *Proc. Natl. Acad. Sc.*, U.S.A., **45**, 932-938.
- BUTENKO R.G., 1960 – Application of a method for cultivation of isolated terminal buds to study the process of growth and organogenesis of plants. *Fiziol. Rasten.*, **7**, 715-723 (Trad. en anglais : *Soviet Plant Physiol.*, 1960, **7**, 590-595).
- BUVAT R., 1944-1945 – Recherches sur la différenciation des cellules végétales. *Ann. Sc. Nat. Bot. Biol. vég.*, **5**, 1-130 ; **6**, 1-119.
- BUVAT R., 1952 – Structure, évolution et fonctionnement du méristème apical de quelques dicotylédones. *Ann. Sc. Nat. Bot. Biol. vég.*, **13**, 199-300.
- BUVAT R., 1955 – Le méristème apical de la tige. *Ann. Biol.*, **31**, 595-656.
- CAMUS G., 1949 – Recherches sur le rôle des bourgeons dans les phénomènes de morphogenèse. *Rev. Cytol. Biol. vég.*, **11**, 1-195.
- CHAMPAGNAT P., 1961 – Dominance apicale, tropisme, épinastie. In *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, W. Ruhland éd., Springer Verlag, Berlin, Göttingen et Heidelberg, **XIV**, 872-908.
- CHOUARD P., 1949 a – Coup d'œil sur les mécanismes régulateurs du développement : 1° chez les plantes annuelles et bisannuelles. *Bull. Soc. bot. France*, **96**, 218-220.

- CHOUARD P., 1949 *b* – Coup d'œil sur les mécanismes régulateurs du développement : 2^o chez les plantes vivaces. *Bull. Soc. bot. France*, **96**, 235-238.
- CHOUARD P., 1949 *c* – Expériences de longue durée sur le photopériodisme ; leçons qui en découlent. *Bull. Soc. bot. France*. Mémoires, 106-146.
- CHOUARD P., 1951 – Premières recherches sur la néoténie expérimentalement provoquée par le photopériodisme chez les plantes à fleur. *Bull. Soc. bot. France*, **98**, 273-276.
- CHOUARD P., 1962 – Quelques réflexions sur la physiologie de la floraison. *Bull. Soc. bot. France*, **109**, 219-241.
- CHOUARD P., 1964 – Vers une conception unitaire des processus de la vernalisation par le froid et par les agents vicariants du froid. *Bull. Soc. fr. Physiol. vég.* (sous presse).
- CHOUARD P. et AGHION D., 1961 – Modalités de la formation de bourgeons floraux sur des cultures de segments de tige de Tabac. *C.R. Acad. Sc.*, **252**, 3864-3866.
- COLEMAN R.E. et NICKELL L.G., 1964 – Stability of the flowering stimulus in isolated stem tips of sugar-cane. *Nature*, **201**, 941-942.
- DORÉ J., 1965 – Physiology of regeneration in cormophytes. In *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, W. Ruhland éd., Springer Verlag, Berlin, Göttingen, et Heidelberg, **XV-1**, 1-91.
- DUARTE I., SPANJERSBERG G. et GAUTHERET R.J., 1963 – Remarques sur la transformation tumorale des tissus de Tabac cultivés *in vitro*. *C.R. Acad. Sc.*, **257**, 2782-2784.
- ESAÛ K., 1938 – Ontogeny and structure of the phloem of Tobacco. *Hilgardia*, **11**, 343-424.
- FARDY A., CUZIN J. et SCHWARTZ D., 1953 – Ontogenèse de *Nicotiana Tabacum* L. Structures et fonctions du méristème apical. *Ann. Inst. Exper. Tabac, Bergerac*, **4**, 73-100.
- GALUN E., JUNG Y. et LANG A., 1962 – Culture and sex modification of male cucumber buds *in vitro*. *Nature*, **194**, 596-598.
- GARNER W.W. et ALLARD H.A., 1920 – Effect of the relative length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants. *J. Agric. Res.*, **18**, 553-606.
- GAUTHERET R.J., 1941 – Recherches sur la croissance des tissus de quelques végétaux appartenant à la famille des Composées. *C.R. Acad. Sc.*, **212**, 1098-1100.
- GAUTHERET R.J., 1942 – Le bourgeonnement des tissus végétaux en culture. *Sciences*, **40**, 95-128.
- GAUTHERET R.J., 1945 – *Une voie d'avenir en biologie végétale : la culture des tissus*, Gallimard, éd., Paris.
- GAUTHERET R.J., 1950 – La culture des tissus végétaux et les phénomènes d'histogenèse. *Ann. biol.*, **54**, 719-744.
- GAUTHERET R.J., 1953 – Recherches anatomiques sur la culture des tissus de rhizomes de Topinambour et d'hybrides de Soleil et de Topinambour. *Rev. gén. Bot.*, **60**, 129-173 et 193-238.
- GAUTHERET R.J., 1959 – *La culture des tissus végétaux*. Masson et Cie éd., Paris.
- GAUTHERET R.J., 1964 – La culture des tissus végétaux ; son histoire, ses tendances. *Rev. Cytol. Biol. vég.*, **27**, 99-220.
- GIFFORD E.M. et LANCE-NOUGARÈDE A., 1964 – The vegetative shoot apex in transition to flowering. *Tenth Intern. Bot. Cong.*, abstract 681, T. et A. Constable Ltd., Edimbourg, 293-294.
- GOODSPEED T.H., 1954 – The genus *Nicotiana*. *Chronica Botanica*, **16**, 1-536.
- HARADA H. et NITSCH J.P., 1959 – Changes in endogenous growth substances during flower development. *Plant Physiol.*, **34**, 409-415.
- HARADA H., 1960 – Extraction de deux substances de floraison. *Ann. Physiol. vég.*, **2**, 249-254.
- HARADA H., 1962 – Etude des substances naturelles de croissance en relation avec la floraison. Isolement d'une substance de montaison. *Rev. gén. Bot.*, **69**, 201-297.
- HENRICKSON C.E., 1954 – The flowering of sunflower explants in aseptic culture. *Plant Physiol.*, **29**, 536-558.
- HILDEBRANDT A.C. et RIKER A.J., 1949 – The influence of various carbon compounds on the growth of marigold, paris-daisy, periwinkle, sunflower and tobacco tissue *in vitro*. *Amer. J. Bot.*, **36**, 74-85.
- IZARD C., 1952 – Etude des tumeurs spontanées de certains hybrides interspécifiques de *Nicotiana*. *Thèse Université Toulouse*.

- JABLONSKI J.R. et SKOOG F., 1954 - Cell enlargement and cell division in excised tobacco pith tissue. *Physiol. Plant*, **7**, 16-24.
- KLEBS G., 1918 - Ueber die Blütenbildung von *Sempervivum*. *Flora*, **111-112**, 128-151.
- KRAUS E.J. et KRAYBILL H.R., 1918 - Vegetation and reproduction with special reference to the tomato. *Oregon Agric. exp. Sta. Bull.*, **149**.
- LANG A., 1952 - Physiology of flowering. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **3**, 265-306.
- LANG A., 1961 *a* - Auxins in flowering. In *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, W. Ruhland éd., Springer Verlag, Berlin, Göttingen et Heidelberg, **XIV**, 909-949.
- LANG A., 1961 *b* - Physiology of Reproductive Development in Higher Plants. In *Physiology of Reproduction. Proceedings of the twenty second Biology colloquium Oregon State University*, Oregon State University Press, Corvallis, Oregon.
- LANG A., SANDONAL J.A. et BEDRI A., 1957 - Induction of bolting and flowering in *Hyoscyamus* and *Samolus* by a gibberellin-like material from a seed plant. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **43**, 960-964.
- LANG A., 1965 - Physiology of flower initiation. In *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, W. Ruhland éd., Springer Verlag, Berlin, Göttingen et Heidelberg, **XV**, 1380-1536.
- LEVINE M., 1923 - Studies on plant cancers. V. Leafy crown-galls on Tobacco plants resulting from *Bacterium tumefaciens* inoculations. *Phytopathology*, **13**, 107-116.
- LEVINE M., 1950 - The growth of normal plant tissue *in vitro* as affected by chemical carcinogens and plant growth substances. III : The culture of sunflower and tobacco stem segments. *Bull. Torrey Bot. Club*, **77**, 110-132.
- LOO S.W., 1946 - Cultivation of excised stem tips of Dodder *in vitro*. *Amer. J. Bot.*, **33**, 295-299.
- MARESQUELLE M., 1964 - Fleurs de renfort et inflorescences de renfort. *Bull. Soc. bot. France*, Mémoires, 93-95.
- MARGARA J., 1965 - Comparaison *in vitro* du développement de bourgeons de la tige florifère de *Cichorium intybus* L. et de l'évolution de bourgeons néoformés. *C.R. Acad. Sc.*, **260**, 278-281.
- MICHNIEWICZ M. et LANG A., 1962 - Effect of nine different gibberellins on stem elongation and flower formation in cold requiring and photoperiodic plants grown under non inductive conditions. *Planta*, **58**, 549-563.
- MILLER C.O. et SKOOG F., 1953 - Chemical control of bud formation in tobacco stem segments. *Amer. J. Bot.*, **40**, 768-773.
- MILLER C.O., SKOOG F., OKUMURA F.S., VON SALTZA M.H. et STRONG F.M., 1956 - Isolation structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division. *J. amer. chem. Soc.*, **78**, 1375-1380.
- MOREL G., 1948 - Recherches sur la culture associée de parasites obligatoires et de tissus végétaux. *Ann. Epiphyt. N.S.*, **14**, 123-234.
- MOREL G. et MARTIN C., 1955 - Guérison des plantes atteintes de maladies à virus par cultures de méristèmes apicaux. *XIVth International Horticultural Congress*. H. Veenman et Zonen, Wageningen (Netherlands), 303-310.
- MOTAMED M., 1964 - Contribution à l'étude des propriétés organogènes de quelques plantes en culture aseptique. *Thèse 3^e Cycle, Physiologie Végétale, Paris*.
- MURASHIGE T., 1961 - Suppression of shoot formation in cultured tobacco cells by gibberellic acid. *Science*, **134**, 280.
- MURASHIGE T., 1964 - Analysis of the inhibition of organ formation in Tobacco tissue culture by gibberellin. *Physiol. Plant*, **17**, 636-643.
- NIEDERGANG-KAMIEN E. et SKOOG F., 1956 - Studies on polarity and auxin transport in plants. Modification of polarity and auxin transport by triiodobenzoic acid. *Physiol. Plant.*, **9**, 60-73.
- NITSCH J.P. et NITSCH C., 1964 - Néof ormation de boutons floraux sur culture *in vitro* de feuilles et de racines de *Cichorium intybus*. Existence d'un état vernalisé en absence de bourgeon. *Bull. Soc. bot. France*, **111**, (sous presse).
- PAULET P. et NITSCH J.P., 1963 - Etude préliminaire du bourgeonnement *in vitro* de *Nicotiana glauca*, *Nicotiana suaveolens* et leur hybride. *Bull. Soc. bot. France*, **110**, 361-366.
- PAULET P. et NITSCH J.P., 1964 *a* - Néof ormation de fleurs *in vitro* sur des cultures de tissus de racines de *Cichorium intybus* L. *C.R. Acad. Sc.*, **258**, 5952-5955.

- PAULET P. et NITSCH J.P., 1964 *b* – La néoformation de fleurs sur culture *in vitro* de racines de *Cichorium intybus* L. étude physiologique. *Ann. Physiol. Vég.*, **6**, 333-345.
- PHINNEY B.O. et WEST C.A., 1961 – Gibberellins and plant growth. In *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, W. Ruhland éd., Springer Verlag, Berlin, Göttingen et Heidelberg, **XIV**, 1185-1227.
- PIERIK R.L.M., 1965 – Regulation of morphogenesis by growth regulators and temperature treatment in isolated tissues of *Lunaria annua* L. *Proc. Kon. Ned. Akad. Wetensch.* (sous presse).
- PLANTEFOL L., 1947 – Hélices foliaires, point végétatif et stèle chez les Dicotylédones. *Rev. gén. Bot.*, **54**, 49-81.
- PRAT H., 1945 – Les gradients histophysiologiques et l'organogenèse végétale. *Rev. Canad. Biol.*, **4**, 543-693.
- RAGHAVEN V. et JACOBS W.P., 1961 – Studies on the floral histogenesis and physiology of *Perilla*. II. Floral induction in cultured apical buds of *P. frutescens*. *Amer. J. Bot.*, **48**, 751-760.
- RAPPAPORT L. et BONNER J., 1960 – Interactions of gibberellin, vernalization, photoperiod and temperature in the flowering of *Endive*. *Plant Physiol.*, **35**, 98-102.
- REINERT J., 1959 – Ueber die kontrolle der morphogenese und die induktion von adventivembryonen an gewebeulturen aus karotten. *Planta*, **53**, 318-333.
- REINHARD E. et LANG A., 1961 – Natural gibberellins in *Hyoscyamus niger* in relation to development especially to flower formation. *Plant Physiol.*, **36**, supp. xii-xiii.
- ROBBINS W.J., 1957 – Gibberellic acid and the reversal of adult *Hedera* to a juvenile state. *Amer. J. Bot.*, **44**, 743-746.
- ROBBINS W.J., 1960 – Further observations on juvenile and adult *Hedera*. *Amer. J. Bot.*, **47**, 485-491.
- RODRIGUES PEREIRA A.S., 1961 – Flower initiation in excised stem disks of wedgewood *Iris*. *Science*, **134**, 2044-45.
- SALISBURY F.B., 1963 – *The flowering process* ; Pergamon Press, Oxford, London, New York, Paris.
- SEGRETAIN G., 1941 – Formation de cals en milieu aseptique à partir de fragments de tige de Tabac. *C. R. Soc. Biol.*, **135**, 648-649.
- SKOOG F., 1944 – Growth and organ formation in tobacco tissue culture. *Amer. J. Bot.*, **31**, 19-24.
- SKOOG F., 1954 – Substances involved in normal growth and differentiation of plants. *Abnormal and pathological plant growth.*, *Brookhaven Symposia in Biol.*, **6**, 1-16.
- SKOOG F., 1955 – Growth factors, polarity and morphogenesis. *Ann. Biol.*, **31**, 201-213.
- SKOOG F. et MILLER C.O., 1957 – Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. In *The Biological Action of Growth Substances. Symp. Soc. Exp. Biol.*, **11**, 118-131.
- SKOOG F. et TSUI C., 1948 – Chemical control of growth and bud formation in tobacco stem segments and callus cultured *in vitro*. *Amer. J. Bot.*, **35**, 782-787.
- SMITH H.H., 1962 – Genetic control of *Nicotiana* plant tumors. *Trans. N.Y. Acad. Sci. Ser. 2*, **24**, 741-746.
- SPANJERSBERG G. et GAUTHERET R.J., 1963 – Sur les facteurs de la néoformation des racines par les tissus de Topinambour cultivés *in vitro*. *Bull. Soc. bot. France*, **110**, 47-66.
- SPANJERSBERG G. et GAUTHERET R.J., 1964 – Nouvelles recherches sur l'action de l'acide gibbérellique sur les tissus de Topinambour cultivés *in vitro*. *C.R. Acad. Sc.*, **258**, 4121-4125.
- STERLING C., 1950 – Histogenesis in tobacco stem segments cultured *in vitro*. *Amer. J. Bot.*, **37**, 467-470.
- STERLING C., 1951 – Origin of buds in tobacco stem segments cultured *in vitro*. *Amer. J. Bot.*, **38**, 761-767.
- STEWART F.C., BLAKELY L.M., KENT A.E. et MAPES M.O., 1963 – Growth and organization in free cell cultures. *Meristems and differentiation, Brookhaven Symposia in Biol.*, **16**, 73-88.
- STONIER T., 1962 – Normal, Abnormal, and Pathological Regeneration in *Nicotiana*. In *Regeneration, 20th Growth Symp. Soc. Study of Development and Growth*, 85-115.
- SUSSEX I.M. et STEEVES T.A., 1958 – Experiments on the control of fertility of fern leaves in sterile culture. *Bot. Gaz.*, **119**, 203-208.
- TCHAILACHIAN M.K., 1961 – Principles of ontogenesis and physiology of flowering in higher plants. *Canad. J. Bot.*, **39**, 1817-1841.

- TCHAILACHIAN M.K. et LOJNIKOVA V.N., 1959 – Influence des substances extraites de feuilles de diverses plantes et analogues à la gibbérelline sur la croissance et la floraison de *Rudbeckia*. *Doklady Acad. Sci. U.R.S.S.*, **128**, 1309-1312.
- TEPPER S.S., GREYSON R.I., GRAIG W.R. et HINDMAN J.L., 1963 – *In vitro* culture of floral buds of *Aquilegia*. *Amer. J. Bot.*, **50**, 1035-1045.
- TORREY J.G., 1958 – Endogenous bud and root formation by isolated roots of *Convolvulus* grown *in vitro*. *Plant Physiol.*, **33**, 258-263.
- WARDLAW C.W., 1965 – The organization of the shoot apex. In *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, W. Ruhland éd., Springer Verlag, Berlin, Göttingen et Heidelberg, **XV-1**, 966-1076.
- WATERKEYN L., MARTENS P. et NITSCH J.P., 1965 – The induction of flowering in *Nicotiana*. I. Morphological development of the apex. *Amer. J. Bot.*, **52**, 264-270.
- WETMORE R.H., 1954 – The use of *in vitro* cultures in the investigation of growth and differentiation in vascular plants. *Abnormal and pathological plant growth. Brookhaven Symposia in Biol.*, **6**, 22-40.
- WHITE P.R., 1939 – Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial nutrient. *Amer. J. Bot.*, **26**, 59-64.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	1
SUMMARY	1
INTRODUCTION	2
HISTORIQUE — La néoformation des bourgeons végétatifs en culture <i>in vitro</i>	3
Quelques considérations sur la floraison	6
La floraison <i>in vitro</i> des bourgeons néoformés	7
MATÉRIEL ET MÉTHODES	
MATÉRIEL : <i>Nicotiana Tabacum</i> L. SOLANACÉE	8
MÉTHODES : 1 — Conditions de culture des plantes mères	10
2 — Techniques conduisant à faire bourgeonner la plante	10
3 — Méthodes d'observations	12
PREMIÈRE PARTIE	
MISE EN ÉVIDENCE D'UN GRADIENT DE FLORAISON LE LONG DE L'AXE DE LA TIGE	13
I — APTITUDE A FLEURIR DES BOURGEONS NÉOFORMÉS CHEZ <i>Nicotiana Tabacum</i> « WISCONSIN 38 »	13
A — Gradient d'aptitude à la floraison des bourgeons néoformés sur des fragments d'entre-nœuds cultivés <i>in vitro</i>	13
A ₁ — Exploration des entre-nœuds des plantes fleuries	14
A ₂ — Exploration des entre-nœuds subterminaux de plantes d'âges divers	19
A ₃ — Conclusions	21
B — Gradient d'aptitude à la floraison des bourgeons néoformés sur la plante entière	22
II — APTITUDE A FLEURIR DES BOURGEONS NÉOFORMÉS CHEZ LE TABAC ET QUELQUES AUTRES ESPÈCES DE <i>Nicotiana</i>	24
DEUXIÈME PARTIE	
ÉTUDE DE L'ORGANOGENÈSE FLORALE A PARTIR DU BOURGEONNEMENT <i>de novo</i>	29
I — MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE D'OBTENTION RÉGULIÈRE DES BOUTONS FLORAUX NÉOFORMÉS	29
1 — Détermination de l'époque de la récolte de la hampe	29
2 — Détermination de la dimension optimale des fragments	30
3 — Exposé de la méthode de culture	32
II — ÉTUDE DESCRIPTIVE DE LA NÉOFORMATION DES FLEURS	34
III — ÉTUDE DES FACTEURS DE L'ENVIRONNEMENT DANS LEURS RAPPORTS AVEC L'ORGANOGENÈSE FLORALE <i>de novo</i>	40
A — Conditions minimales nécessaires à la néoformation de boutons floraux, <i>in vitro</i> à partir des fragments de hampe de <i>Tabac</i>	40

B — Action des glucides	42
B ₁ — Effet de différents glucides sur l'organogenèse florale	42
B ₂ — Effet de différentes concentrations de glucides sur la néoformation des boutons floraux à partir des fragments de hampe	44
B ₃ — Effet de différentes concentrations de glucose sur l'expression du gradient axial de floraison	46
B ₄ — Effet de différentes concentrations de glucose dans deux cas particuliers où le gradient de floraison n'est pas observé	49
C — Action de la lumière	50
C ₁ — Action de la lumière sur l'organogenèse florale	50
C ₂ — Organogenèse florale à l'obscurité.	51
C ₃ — Action de la lumière au cours du déroulement de l'organogenèse florale	52
C ₄ — Action du glucose sur la néoformation des boutons floraux à l'obscurité	54
IV — MODIFICATIONS APPORTÉES PAR L'ADJONCTION AU MILIEU DE SUBSTANCES DE CROISSANCE	55
A — Action de la kinétine et de l'auxine sur l'organogenèse florale	55
A ₁ — Résultats généraux concernant l'organogenèse	55
A ₂ — Action de la kinétine en fonction de la teneur en sucre du milieu, sur l'aptitude à fleurir des bourgeons néoformés	56
A ₃ — Action conjuguée de l'auxine et de la kinétine sur l'aptitude à fleurir des bourgeons néoformés. Influence de la teneur en sucre du milieu	57
B — Action de l'acide gibbérellique	58
B ₁ — Action primaire de GA ₃ sur l'organogenèse	60
B ₂ — Action de GA ₃ au cours du déroulement de l'organogenèse florale	61
DISCUSSION	65
REMERCIEMENTS	70
BIBLIOGRAPHIE	71

DEUXIÈME THESE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

**ORGANOGENÈSE AU NIVEAU
DES TUMEURS EXPÉRIMENTALES**

Vu et approuvé :

Paris, le 6 juillet 1965

Le Doyen de la Faculté des Sciences

Marc ZAMANSKY

Vu et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris

Jean ROCHE

IMPRIMÉ EN FRANCE

MB IMPRIMERIE
MARCEL BON
VESOUL - 70

D.L. IMP. 1217 - ED. 1319

IV - 1965

